



FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría

**MOVILIZACIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES
DE TUMOR A SANGRE PERIFÉRICA EN UN
MODELO MURINO DE NEUROBLASTOMA
ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO, CLONAL Y
FUNCIONAL**

TESIS DOCTORAL

Manuel Leónidas Espinoza Vega

Madrid, 2020

MOVILIZACIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR A SANGRE PERIFÉRICA EN UN MODELO MURINO DE NEUROBLASTOMA ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO, CLONAL Y FUNCIONAL

TESIS DOCTORAL

Manuel Leónidas Espinoza Vega

DIRECTORES

Dr. Manuel Ramírez Orellana

Dra. Ana Lourdes Luis Huertas

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PI13/02487, Instituto de Salud Carlos III. El laboratorio de Manuel Ramírez recibe ayudas de la Asociación Pablo Ugarte (<http://www.asociacionpablougarte.es/>), Asociación NEN (<http://asociacion-nen.org/>), Fundación Neuroblastoma (www.fneuroblastoma.org) y Fundación Oncohematología Infantil (fundacionfoi.org).

A mi madre

Agradecimientos

Tengo que reconocer que me hacía muy especial ilusión escribir este apartado del manuscrito de mi Tesis Doctoral; el último que he redactado, pero en el que llevo pensando desde que comencé este camino.

En primer lugar, quería dar las gracias a mis directores, Manuel Ramírez y Ana Lourdes Luis, por su disponibilidad, su cercanía, sus buenos consejos y su apoyo en los momentos más difíciles de esta etapa formativa. No creo que hubiera podido contar con mejores mentores. Mi aprecio y mi enorme respeto por vuestra calidad humana y profesional espero que se vea reflejado a lo largo de mi carrera laboral e investigadora como muestra de todo lo que he aprendido de vosotros. Gracias por enseñarme no sólo una forma de trabajar, de formularme preguntas y de buscar respuestas, sino por compartir conmigo unos valores como la humildad, la inquietud por la investigación y el trabajo en equipo, que desde estos años y para siempre, también haré míos. A Manuel Ramírez, gracias por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Espero que, a pesar de ser la tesis doctoral más rocambolesca que hayas dirigido, estés orgulloso de ella.

Son muchas las personas que han colaborado en el desarrollo de este trabajo y a todas ellas debo un sentido reconocimiento. A Gustavo Melen, que me acompañó en mis primeras inmersiones en el laboratorio y que hizo tan fácil algo que parecía imposible. A África González Murillo, a la que considero una persona fundamental en mi aprendizaje. De las mañanas y tardes de laboratorio, animalario y citómetro guardaré siempre bonitos recuerdos de nuestras conversaciones. A Lidia Franco, para mí, mi “coR” de tesis (salvando las distancias). Gracias por ser un referente de constancia y perseverancia; gracias por estar disponible para solucionar todas mis dudas y para echarme una mano. Te deseo toda la suerte del mundo en tu nueva etapa; te la mereces. A los tres, nunca serán suficientes las gracias por vuestra ayuda. A Jesús Martínez y Edilia Almeida del CIEMAT, por su accesibilidad, sus enseñanzas y su apoyo en el animalario. A todas las personas que han trabajado y trabajan en el laboratorio, cuya profesionalidad, positividad y amabilidad hicieron de un ambiente, al principio completamente desconocido, un lugar tan querido ahora.

A mis compañeros del servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, con los que he aprendido y aprendo la profesión que adoro y con los que tengo la suerte de compartirla. A todos, adjuntos y residentes, gracias por todo lo que me enseñáis. A Henar Souto, gracias por ser compañera, pero sobretodo, amiga. Espero que este trabajo esté a la altura de tus expectativas y que sigamos celebrando éxitos juntos por muchos años.

A todas las personas que forman mi “familia elegida”, por darme ánimos y mostrarme su apoyo en estos años, haciendo que tenga la oportunidad de escribir estas palabras. A Noelia, por dejarme descubrir el mundo a su lado. A No Damos Crédito, por ser más que un grupo de amigos, por enseñarme tanto, tanto y tanto, por vuestra comprensión con mi disponibilidad y, a pesar de ello, por darme de los mejores recuerdos de mi vida. A los autonomitos, a mis “coRs”, a los Brazzavilles, Celia y Laurentie, y a Juanan, por estar siempre ahí. A David Andina, que algún día cambiará el mundo pero que, al dejarse conocer, cambió el mío. Al Dr. Álvarez Alonso, César, gracias por todo lo vivido juntos (y por casi movilizar al MIT para recuperar la información de un disco duro quemado), eres una persona excepcional. A Anto, Sandra, Miki, Bárbara, Pequeñito, Vipi, Adela, Confo, Jali, Pablo, Delfy, Manu, Chao, Gon, Abel, Guzz, Ale, Mon, Rebeca, Blanco, Dani, Clara, Garcés, Tamarananana, Ángel, Espe, Amaya, Pablo, Sariña, Ove, Laura e Isabel, por hacer la vida mejor. Y, por supuesto, a Alejandro Clemente, que pasó horas y horas escuchando palabras y datos sin sentido para él, con la enorme paciencia y cariño que le caracterizan. Gracias por darme paz en los agobios de la recta final.

Por último, me gustaría dar las gracias a las personas más importantes de mi vida. Mis hermanos: Juan, Moisés, Matilde, Paul, Lucila y Almudena, y mis padres: Víctor y Montse. Mi mejor equipo. Para mí, esto es un logro colectivo, de todos. Vuestra ayuda, vuestro cuidado y vuestro cariño a lo largo de todos estos años son los que me han hecho llegar hasta aquí. Me siento tremendamente orgulloso de cada uno de vosotros y enormemente afortunado de la familia que formamos. He guardado estas últimas palabras para mi madre, la razón de todo. La persona que desde su experiencia vital me inculcó desde pequeño, con todo el cariño y el amor del mundo, el valor del esfuerzo, la pasión por el estudio, la lectura y el teatro, la curiosidad por el mundo que me rodea y, lo más importante, la bondad hacia el prójimo. Todas tus lecciones de vida y tu frase “el no ya lo tienes” me acompañarán siempre.

ABREVIATURAS

ACT	<i>adoptive cell therapy</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i>
AURKA	quinasa Aurora A
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CCSG	<i>Children's Cancer Study Group</i>
CDR3	<i>complementarity determining region 3</i>
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
CPNM	carcinoma de pulmón no microcítico
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocytes associated protein-4</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DOTA-TATE	1,4,7,10 -tetraazacyclododecane,1,4,7,10 – tetraacetic acid - Tyr3-octreotate
EDTA	Etilendiaminotetra-acético
EMR	enfermedad mínima residual
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GD2	disialogangliósido
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEPA	<i>High efficiency particulate air</i>
IDO	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IDRFs	<i>image-defined risk factors</i>

Ig	Inmunoglobulina
IL-	interleuquina -
INF	interferón
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Committee</i>
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group staging system</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IUCC	<i>International Union Against Cancer</i>
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene-3</i>
LAK	<i>lymphokine-activated killer</i>
MACS®	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MDSCs	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
mEGF	<i>murine Epidermic Grow Factor</i>
mFGF	<i>murine Fibroblastic Grow Factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIBG-I ¹³¹	Metaiodobenzilguanidina - iodo-131
MKI	<i>mitosis-karyorrhexis index</i>
MYCN	gen N-myc
NB36769	línea celular de neuroblastoma 36769
NK	<i>natural killer</i>
NSG	<i>next-generation sequencing</i>
ODC	ornitina descarboxilasa
OEBA	Órgano para Evaluar el Bienestar Animal
PBS	<i>Phospate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1L	<i>programmed cell death-1</i>
PH	progenitores hematopoyéticos

PHA	fitohemaglutinina
POG	<i>Pediatric Oncology Group</i>
r.p.m.	revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SG	supervivencia general
SJCRH	<i>St. Jude Children's Research Hospital</i>
SLE	supervivencia libre de eventos
SNC	sistema nervioso central
TAA _s	<i>tumor-associated antigens</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TH-MYCN	mutación del oncogén <i>MYCN</i> que condiciona la amplificación del mismo por medio de la presencia del promotor de la tirosina hidroxilasa de rata
TIL _s	<i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin protein-3</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TPH	trasplante de progenitores hematopoyéticos
T _{reg}	células T reguladoras
TrkB	quinasa B relacionada con la tropomiosina
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	<i>wild type</i>

ÍNDICE

1. <u>Introducción</u>	1
1.1. El neuroblastoma	3
1.1.1. Origen del neuroblastoma	3
1.1.2. Histología tumoral	3
1.1.3. Marcadores moleculares: <i>MYCN</i>	5
1.1.4. Estadíaje del neuroblastoma: INSS e INRGSS	6
1.1.5. Clasificación del neuroblastoma según grupos de riesgo	8
1.1.6. Tratamiento actual del neuroblastoma	9
1.1.7. Nuevas estrategias terapéuticas	11
1.1.7.1. Dianas génicas	11
1.1.7.2. Radioterapia	12
1.1.7.3. Inmunoterapia	12
1.2. Respuesta inmune frente al cáncer	13
1.2.1. Primeras teorías: la hipótesis de la <i>Vigilancia Inmunológica</i>	14
1.2.2. Inmunoección del cáncer	14
1.2.3. Infiltrado inmune intratumoral: los Linfocitos Infiltrantes de Tumor	18
1.2.4. TILs en el tratamiento contra el cáncer: la terapia celular adoptiva	20
1.2.4.1. IL-2, células NK y LAK	21
1.2.4.2. TILs, clones de células T primadas por APC y células T citotóxicas 4-1BB	21
1.2.4.3. Células T CAR y TCR	23
1.2.5. Los TILs y la terapia celular adoptiva en el tratamiento del neuroblastoma	24
1.2.6. Avances recientes en el uso de TILs: la biopsia líquida	24
2. <u>Justificación, hipótesis y objetivos</u>	27
2.1. Justificación	29
2.2. Hipótesis	29
2.3. Objetivos	30
2.3.1. Objetivos principales	30
2.3.2. Objetivos secundarios	30
3. <u>Material y métodos</u>	31
3.1. Modelo experimental de neuroblastoma en ratones inmunodeficientes: circulación de TILs por el organismo	33
3.1.1. Animales de experimentación	33
3.1.2. Línea celular de neuroblastoma	33

3.1.3.	Implante subcutáneo de neuroesferas a ratones <i>NOD scid gamma</i>	34
3.1.4.	TILs provenientes de ratones inmunocompetentes portadores de neuroblastoma con la mutación TH-MYCN	35
3.1.5.	Movilización de TILs por el organismo en el modelo inmunodeficiente	35
3.1.6.	Sacrificio	35
3.1.7.	Procesamiento de las muestras de sangre periférica	35
3.1.8.	Procesamiento del bazo	36
3.2.	Modelo experimental de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes: movilización de TILs a sangre periférica	36
3.2.1.	Animales de experimentación	36
3.2.2.	Implante de neuroesferas a ratones WT 129/SvJ	37
3.2.3.	Movilización de TILs a sangre periférica en el modelo experimental	38
3.2.4.	Sacrificio	39
3.2.5.	Procesamiento de las muestras de sangre periférica	39
3.2.6.	Procesamiento de las muestras tumorales	39
3.3.	Secuenciación del repertorio de TCR	40
3.3.1.	Purificación de ADN de sangre periférica y muestras tumorales	40
3.3.2.	Concentración del ADN purificado	40
3.3.3.	Control de calidad de las muestras de ADN	40
3.3.4.	Inmunosecuenciación de la región TCR- β	41
3.4.	Inmunofenotipo mediante citometría de flujo	43
3.4.1.	Citometría de flujo en los experimentos con ratones inmunodeficientes	43
3.4.2.	Citometría de flujo en los experimentos con ratones inmunocompetentes	43
3.5.	Cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos T murinos	44
3.5.1.	Cultivo de esplenocitos de ratones 129/SvJ	44
3.6.	Co-cultivos <i>in vitro</i> de neuroesferas NB36769 y TILs	44
3.6.1.	Obtención de TILs de sangre periférica	44
3.6.2.	Marcaje de los linfocitos con CFSE	46
3.6.3.	Ensayo funcional de proliferación de los TILs frente a neuroesferas	46
3.6.4.	Citometría de flujo	46
3.7.	Análisis estadístico	47

4. Resultados	49
4.1. Inyección de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en ratón inmunodeficiente para el análisis de la circulación linfocitaria por el organismo	51
4.1.1. La subpoblación principal de linfocitos en sangre periférica tras la inyección de TILs en el ratón inmunodeficiente corresponde a linfocitos T CD4	52
4.1.2. La subpoblación de linfocitos que expresan el marcador PD1 es mayor en el bazo que en sangre periférica tras la inyección de TILs en el ratón inmunodeficiente	53
4.2. Movilización de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en el ratón inmunocompetente	55
4.2.1. La movilización con G-CSF de linfocitos T a sangre periférica en el ratón inmunocompetente es dosis dependiente	56
4.3. Identificación del repertorio de células T infiltrantes de tumor en el neuroblastoma y su movilización a sangre periférica	60
4.3.1. Existencia de una distribución clonal específica de los linfocitos T en las muestras tumorales	61
4.3.2. Existencia de secuencias TCR- β compartidas entre diferentes muestras tumorales en el neuroblastoma	63
4.3.3. La movilización con G-CSF aumenta el número de clonotipos compartidos en la sangre periférica	64
4.4. Funcionalidad de linfocitos circulantes que incluyen TILs en cultivo <i>in vitro</i>	66
4.4.1. Optimización de las condiciones de cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos murinos	66
4.5. Capacidad funcional de linfocitos T de sangre periférica que incluyen TILs frente a células tumorales	68
4.5.1. La movilización con G-CSF favorece la proliferación de linfocitos T circulantes en sangre periférica que incluyen TILs al co-cultivarlos con células tumorales a una ratio 1:1	69
5. Discusión	75
6. Conclusiones	87
7. Bibliografía	91
8. Anexos	109

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL NEUROBLASTOMA

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la edad pediátrica con una incidencia anual de 1,1 cada 100000 niños de entre 0 y 14 años. Además, constituye hasta el 7% de todos los tumores malignos en pacientes menores de 15 años^(1,2). Su presentación clínica es muy heterogénea abarcando un amplio espectro de posibilidades: desde los casos asintomáticos, hasta la presentación de síntomas sistémicos, neurológicos, urinarios, digestivos o de cualquier otro derivado de los órganos afectados. De forma característica, su biología molecular influye de forma determinante en su pronóstico, que también varía ampliamente: entre los pacientes de curso más favorable, que experimentan una regresión espontánea del tumor, hasta los de peor pronóstico con una progresión metastásica incontrolable^(3,4). Este escenario condiciona que actualmente las tasas de mortalidad en el grupo de pacientes con tumores de alto riesgo sean superiores al 60% a pesar de la aplicación de estrategias de terapia intensiva multimodal^(5,6). En la actualidad, el neuroblastoma supone hasta el 15% de todas las muertes por cáncer en la edad pediátrica⁽⁷⁾.

1.1.1. Origen del neuroblastoma

El neuroblastoma es un tumor sólido que se origina a partir de las células de la cresta neural, estructura embrionaria transitoria cuya diferenciación coincide con el desarrollo del tubo neural, que dará lugar al sistema nervioso central (SNC). Estas células provenientes del tejido neuroectodérmico, migran a lo largo del embrión en desarrollo y se diferencian en varios subtipos celulares como: melanocitos, condroblastos, osteoblastos o células del tejido conectivo; así como en células del SNC (neuronas y células de la glía) y sistema nervioso periférico (neuronas del sistema nervioso simpático y células de Schwann)⁽⁸⁾. En relación a este origen embriológico, el neuroblastoma es una neoplasia de la estirpe simpático-adrenérgica cuyo origen asienta en las células ganglionares del sistema nervioso periférico simpático en cualquiera de sus estructuras. Sin embargo, la mayoría de los tumores primarios se originan en el abdomen (> 65%), siendo la glándula suprarrenal la estructura principalmente implicada, seguido de la afectación paravertebral abdominal, torácica, cervical o pélvica⁽⁹⁾.

1.1.2. Histología tumoral

La histología del neuroblastoma, también influenciada en gran medida por sus marcadores genéticos y con implicación pronóstica a su vez, se presenta con diferentes características y variabilidad en cuanto al tipo celular, grado de diferenciación y mitosis. De esta

manera, podemos encontrar tumores compuestos predominantemente por células azules, redondeadas y de pequeño tamaño muy inmaduras conocidas como neuroblastos que determinan un peor pronóstico o neoplasias con un componente completamente maduro de células ganglionares y rico en estroma, en el caso de los ganglioneuromas: los tumores de mejor pronóstico (figura 1). En los casos intermedios, se observan células en variables grados de diferenciación, con componentes de ambos tipos, como ocurre en los ganglioneuroblastomas o neuroblastomas en diferenciación⁽¹⁰⁾.

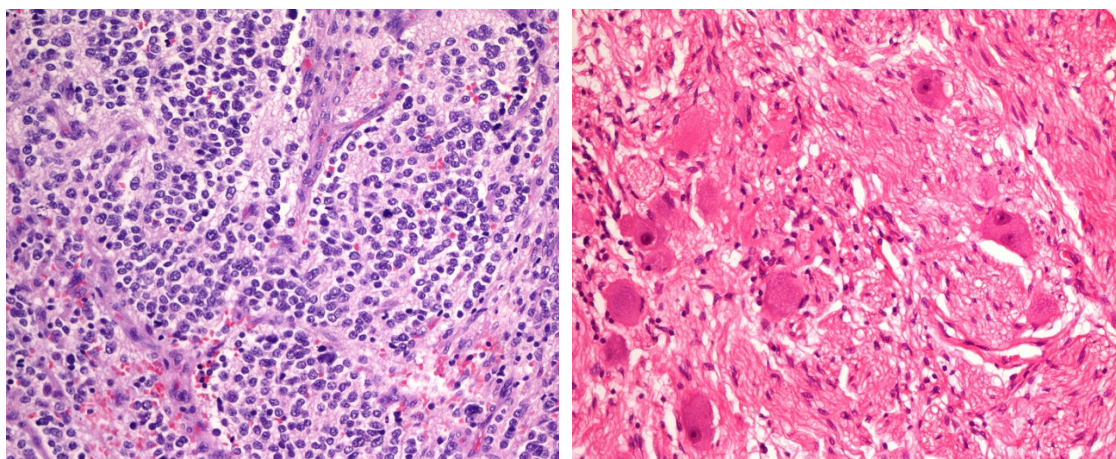


Figura 1. Imágenes correspondientes al estudio histológico mediante microscopía óptica con tinción hematoxilina – eosina a un aumento de 20x. Izquierda: histología de un neuroblastoma pobremente diferenciado de localización suprarrenal. Derecha: histología de un ganglioneuroma maduro de localización torácica. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús; Dr. Azorín.

En 1984, Shimada H y cols. describieron la primera clasificación que relacionaba los hallazgos histopatológicos relativos a: grado de diferenciación del neuroblasto, presencia o no del estroma Schwanniano (“neuroblastoma rico o pobre en estroma”), índice de proliferación celular (índice mitosis-cariorrexis; MKI, de sus siglas en inglés *mitosis-karyorrhexis index*), patrón nodular y edad, con el pronóstico de la enfermedad. Se establecieron de esta manera dos categorías pronósticas⁽¹¹⁾:

- Grupo histológico favorable: pacientes <1,5 años de edad, MKI bajo o intermedio y tumor diferenciado/parcialmente diferenciado, o pacientes de 1,5 – 5 años con MKI bajo y tumor diferenciado.
- Grupo histológico desfavorable: paciente de cualquier edad con tumores con patrón nodular; pobres en estroma y MKI elevado.

Posteriormente, esta clasificación quedó integrada en 1999 en otra más actualizada con pequeñas modificaciones, desarrollada por el grupo internacional de expertos: *International Neuroblastoma Pathology Committee* (INPC). En ella, se distribuía a los pacientes con neuroblastoma en subgrupos de riesgo en función de la edad y los hallazgos histopatológicos (tabla I)⁽¹²⁾.

International Neuroblastoma Pathology classification		Original Shimada classification	Prognostic group
Neuroblastoma	(Schwannian stroma-poor) ^a	Stroma-poor	
Favorable		Favorable	Favorable
< 1.5 yrs	Poorly differentiated or differentiating & low or intermediate MKI tumor		
1.5-5 yrs	Differentiating & low MKI tumor		
Unfavorable		Unfavorable	Unfavorable
< 1.5 yrs	a) undifferentiated tumor ^b b) high MKI tumor		
1.5-5 yrs	a) undifferentiated or poorly differentiated tumor b) intermediate or high MKI tumor		
≥5 yrs	All tumors		
Ganglioneuroblastoma, intermixed	(Schwannian stroma-rich)	Stroma-rich Intermixed (favorable)	Favorable ^c
Ganglioneuroma	(Schwannian stroma-dominant)		
Maturing		Well differentiated (favorable)	Favorable ^c
Mature		Ganglioneuroma	
Ganglioneuroblastoma, nodular	(composite Schwannian stroma-rich/stroma-dominant and stroma-poor)	Stroma-rich nodular (unfavorable)	Unfavorable ^c

MKI: mitosis-karyorrhexis index.
^a Subtypes of neuroblastoma were described in detail elsewhere.¹⁰
^b Rare subtype, especially diagnosed in this age group. Further investigation and analysis required.
^c Prognostic grouping for these tumor categories is not related to patient age.

Tabla I. Clasificación histológica del neuroblastoma propuesta por el INPC⁽¹²⁾.

1.1.3. Marcadores moleculares: *MYCN*

Al contrario del elevado índice de mutaciones que se encuentran en los tumores sólidos de los pacientes adultos, la frecuencia de mutaciones en el neuroblastoma es especialmente baja. Sin embargo, en los últimos 30 años, se han realizado importantes avances en la identificación de marcadores biológicos en el neuroblastoma que se asocian a un determinado comportamiento clínico y que tienen repercusión en el pronóstico de estos pacientes. Entre ellas, la pérdida de heterocigosidad debido a deleciones en el brazo corto del cromosoma 1 (1p), la pérdida alélica del brazo largo del cromosoma 11 (11q), ganancia del alelo 17q o hiperploidía del ADN⁽⁹⁾. Además, los estudios de secuenciación genómica han permitido identificar algunos genes con significación biológica en este tipo de tumores, siendo los más destacados: PTPN11, ATRX, NRA, N-myc (*MYCN*) y ALK⁽¹³⁾. Entre ellos, destaca *MYCN* (2p²⁴), un oncogén de la familia MYC cuya amplificación aparece hasta en el 20% de los pacientes y que se correlaciona estrechamente con una presentación de la enfermedad en estadios más avanzados,

considerándose un marcador independiente de mal pronóstico⁽¹⁴⁾. Esta asociación fue descrita por primera vez en 1983 por Schwab y cols.⁽¹⁵⁾. Se trata de un factor de transcripción que controla la expresión de múltiples genes involucrados en procesos de proliferación, crecimiento celular, síntesis proteica, metabolismo, apoptosis y diferenciación (figura 2). Su identificación ha servido para el desarrollo de modelos preclínicos genéticos de neuroblastoma, mostrando una enorme importancia en la investigación y desarrollo de nuevas dianas terapéuticas en pacientes con tumores de alto riesgo, dado que se trata de una oncoproteína específica de estos tejidos⁽¹³⁾.

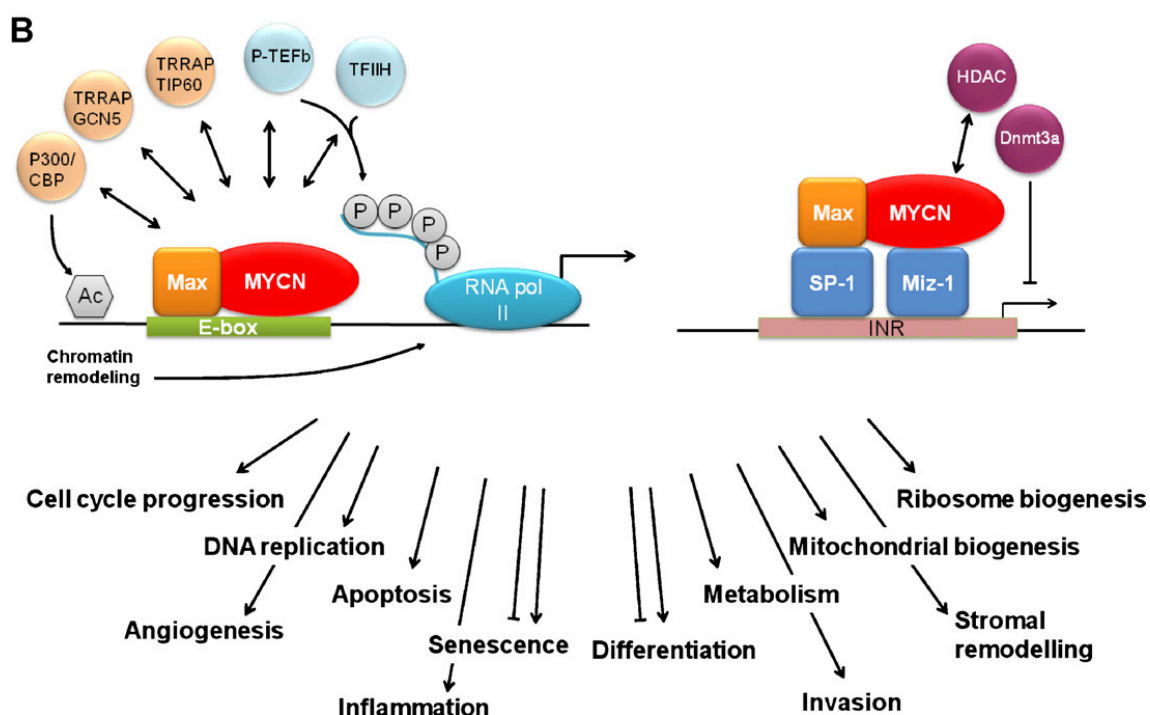


Figura 2. Esquema representativo de la estructura de la proteína MYCN y su implicación en la regulación de múltiples procesos celulares⁽¹⁶⁾.

1.1.4. Estadaje del neuroblastoma: INSS e INRGSS

Hasta finales de los años 80 se utilizaron diferentes sistemas de estadaje del neuroblastoma. Los más extendidos eran los sistemas de clasificación del *Children's Cancer Study Group* (CCSG); el utilizado por el *St. Jude Children's Research Hospital* (SJCRH), el *Pediatric Oncology Group* (POG); y el derivado de la clasificación *Tumor Node Metastasis* (TNM) propuesto por la Asociación Internacional Contra el Cáncer (*International Union Against Cancer*; IUAC). Sin embargo, estos sistemas presentaban entre sí diferencias sustanciales en relación, no sólo, al valor pronóstico de factores como la resecabilidad del tumor o la afectación linfática

contralateral, sino también al grado de respuesta a un determinado tratamiento. Con el objetivo de permitir la comparación entre diferentes grupos oncológicos y analizar los resultados en cuanto al tratamiento, en 1986 una conferencia de expertos desarrolló el *International Neuroblastoma Staging System* (INSS), que distribuía a los pacientes según una estratificación postquirúrgica basada en criterios clínicos, radiológicos y quirúrgicos^(17,18). Una de las principales desventajas de esta clasificación se basa en que uno de los aspectos más relevantes a tener en cuenta para la estadificación de la extensión de la enfermedad locorregional depende del procedimiento quirúrgico realizado, un hecho que puede presentar una enorme variabilidad entre centros.

Debido a esta heterogeneidad en la interpretación de los hallazgos intraoperatorios y la realización de diferentes procedimientos quirúrgicos, el INSS ha sido sustituido en las últimas dos décadas por un sistema de estadiaje que permite la clasificación de los pacientes de forma previa a iniciar cualquier tipo de tratamiento.

En 2005, el *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) analizó los datos obtenidos a partir de 8800 pacientes con neuroblastoma tratados en Europa, Japón, Norteamérica y Australia entre 1990 y 2002. En base a este análisis, se han definido los factores de riesgo definidos por imagen o IDRFs (por sus siglas en inglés, *image-defined risk factors*), que junto a otros factores como la edad o la extensión de la enfermedad, establecen el sistema de estadiaje publicado por Monclair T y cols. en 2009, conocido como INRGSS (por sus siglas en inglés, *INRG staging system*) para la estratificación del riesgo del neuroblastoma (tablas II y III)⁽¹⁹⁾.

Stage	Description
L1	Localized tumor not involving vital structures as defined by the list of image-defined risk factors and confined to one body compartment
L2	Locoregional tumor with presence of one or more image-defined risk factors
M	Distant metastatic disease (except stage MS)
MS	Metastatic disease in children younger than 18 months with metastases confined to skin, liver, and/or bone marrow

Tabla II. Sistema de estadiaje propuesto por el *International Neuroblastoma Risk Group*: INRGSS⁽¹⁹⁾.

Ipsilateral tumor extension within two body compartments
Neck-chest, chest-abdomen, abdomen-pelvis
Neck
Tumor encasing carotid and/or vertebral artery and/or internal jugular vein
Tumor extending to base of skull
Tumor compressing the trachea
Cervico-thoracic junction
Tumor encasing brachial plexus roots
Tumor encasing subclavian vessels and/or vertebral and/or carotid artery
Tumor compressing the trachea
Thorax
Tumor encasing the aorta and/or major branches
Tumor compressing the trachea and/or principal bronchi
Lower mediastinal tumor, infiltrating the costo-vertebral junction between T9 and T12
Thoraco-abdominal
Tumor encasing the aorta and/or vena cava
Abdomen/pelvis
Tumor infiltrating the porta hepatis and/or the hepatoduodenal ligament
Tumor encasing branches of the superior mesenteric artery at the mesenteric root
Tumor encasing the origin of the coeliac axis, and/or of the superior mesenteric artery
Tumor invading one or both renal pedicles
Tumor encasing the aorta and/or vena cava
Tumor encasing the iliac vessels
Pelvic tumor crossing the sciatic notch
Intraspinal tumor extension whatever the location provided that:
More than one third of the spinal canal in the axial plane is invaded and/or the perimedullary leptomeningeal spaces are not visible and/or the spinal cord signal is abnormal
Infiltration of adjacent organs/structures
Pericardium, diaphragm, kidney, liver, duodeno-pancreatic block, and mesentery
Conditions to be recorded, but <i>not</i> considered IDRFs
Multifocal primary tumors
Pleural effusion, with or without malignant cells
Ascites, with or without malignant cells

Tabla III. Factores de riesgo definidos por imagen: *Image-Defined Risk Factors* (IDRFs)⁽¹⁹⁾.

1.1.5. Clasificación del neuroblastoma según grupos de riesgo

Finalmente, con el objetivo de establecer un consenso para permitir la comparación de diferentes tratamientos en ensayos clínicos en todo el mundo, el INRG desarrolló un sistema de clasificación utilizando los factores pronósticos con significación clínica y estadística analizados en la cohorte de 8800 pacientes comentada previamente. A diferencia de la clasificación propuesta por el INPC, el sistema de clasificación del INRG incorpora las alteraciones genéticas que han demostrado una significación pronóstica en este tipo de tumores. De esta manera, utilizando diferentes combinaciones de siete factores pronósticos estratifica a los pacientes en 16 grupos pretratamiento (nombrados de la A a la R) según el riesgo (muy bajo, bajo, intermedio y alto) en base a diferentes puntos de corte de supervivencia libre de eventos (SLE) (tabla IV)⁽²⁰⁾. Los pacientes con un riesgo muy bajo tienen una SLE a 5 años > 85%, y ésta disminuye a > 75% pero es ≤ 85% para los pacientes de riesgo bajo, ≤ 75% o ≥ 50% para los de riesgo intermedio y

es < 50% para los de alto riesgo. Además, en los últimos años, diferentes grupos han comenzado a utilizar el término neuroblastoma de ultra-alto riesgo para referirse a un subgrupo de pacientes de alto riesgo que presentan una enfermedad refractaria, defunción en los primeros 18 meses desde el diagnóstico o una SLE del 10-15%⁽²¹⁾. Una de las principales razones para establecer un consenso en torno a esta definición consiste en identificar pacientes con un peor resultado a pesar del tratamiento intensivo que puedan beneficiarse de alternativas terapéuticas.

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low
				Amp			K High
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
					Yes		G Intermediate
	>= 18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	No		E Low
			Poorly differentiated or undifferentiated	NA	Yes		H Intermediate
				Amp			N High
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate
	< 18			Amp			O High
	>= 18						P High
MS					No		C Very low
	< 18			NA	Yes		Q High
				Amp			R High

Tabla IV. Esquema de clasificación pretratamiento del *International Neuroblastoma Risk Group*: INRG⁽²⁰⁾.

1.1.6. Tratamiento actual del neuroblastoma

Hoy en día, el abordaje terapéutico utilizado en los pacientes con neuroblastoma se fundamenta en un tratamiento multimodal en función de la clasificación en grupos de riesgo (INRGSS) y su consecuente pronóstico.

Los pacientes con riesgo bajo o intermedio se tratan según el protocolo europeo LINES (*Low and Intermediate Risk Neuroblastoma Protocol; 2010-021396-81; SIOPEN R NET*) cuyos objetivos principales consisten en: 1) reducir los regímenes de quimioterapia en los pacientes con neuroblastoma de bajo riesgo (L2 sin alteraciones segmentarias cromosómicas) con el fin de disminuir la morbilidad y toxicidad asociada, manteniendo unas cifras de supervivencia en torno al 100%; y 2) la adición de pautas de tratamiento con radioterapia y ácido retinoico (13-

cis-RA) en las casos de neuroblastoma de riesgo intermedio (L2, > 18 meses de edad e histología de tumor mal diferenciado o indiferenciado), para la consecución de una supervivencia general (SG) del 90%.

Por otra parte, los esquemas de tratamiento de los pacientes con tumores de alto riesgo (*HR-NB protocols*) han cambiado notablemente con la utilización sistemática de altas dosis de quimioterapia, el trasplante de progenitores hematopoyéticos (PH) autólogo o la introducción de la inmunoterapia (figura 3). Estas nuevas terapias han promovido mejoras en cuanto a la SLE en determinados pacientes, pero aún la mortalidad global de este grupo permanece cercana al 50%, siendo necesarios más avances en el desarrollo de terapias “diana”, dirigidas a los cambios celulares o marcadores moleculares involucrados en el mal pronóstico de este grupo de pacientes.

La estrategia actual de tratamiento para los pacientes de alto riesgo incluye una fase de inducción con cinco o seis ciclos de quimioterapia asociados al tratamiento quirúrgico cuando los IDRFs sean más favorables. Posteriormente, una fase de consolidación con altas dosis de quimioterapia, TPH autólogo y radioterapia. Finalmente, una fase de mantenimiento o post-consolidación con inmunoterapia para tratar la enfermedad mínima residual (EMR)⁽²²⁾.

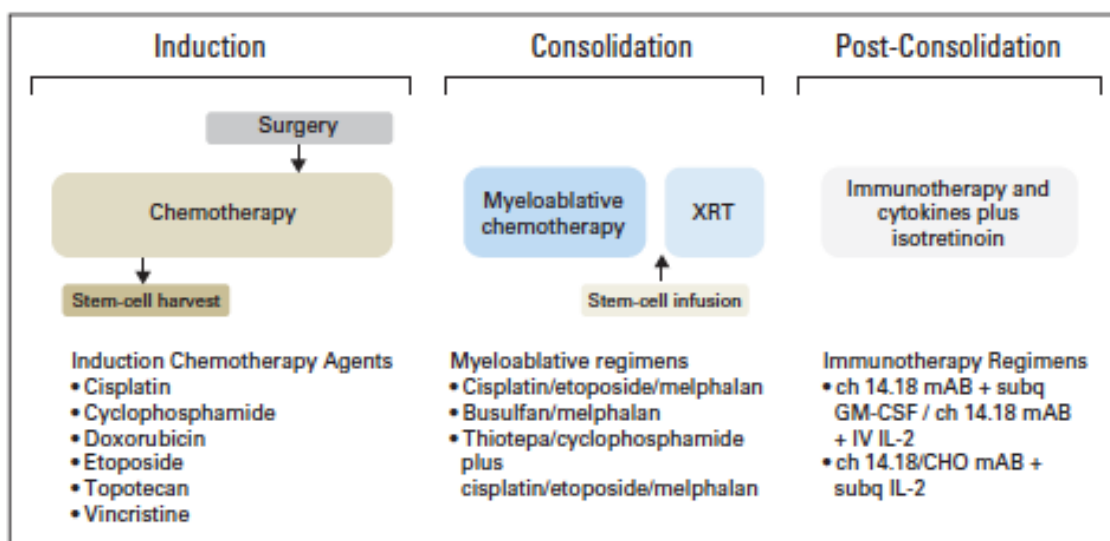


Figura 3. Estrategia de tratamiento para los neuroblastomas de alto riesgo⁽²²⁾.

Con esta intensificación del tratamiento, diferentes estudios han mostrado un aumento de la SLE ($66 \pm 5\%$ vs. $46 \pm 5\%$ a 2 años, $p = 0,01$) y la SG ($86 \pm 4\%$ vs. $75 \pm 5\%$ a 2 años, $p = 0,02$)⁽²³⁻²⁵⁾. Sin embargo, a pesar de esta mejoría, una proporción considerable de pacientes no presentará respuesta a los tratamientos convencionales o experimentará una recaída de la enfermedad con una SG a 5 años del $20\% \pm 1\%$ ⁽²⁶⁾.

1.1.7. Nuevas estrategias terapéuticas

Dada esta inaceptable mortalidad en la población de pacientes con neuroblastomas de alto riesgo, el desarrollo de opciones terapéuticas novedosas supone el reto actual de la investigación oncológica en este tipo de tumor.

Los avances llevados a cabo durante los últimos años en el campo de la biología molecular y la secuenciación génica aplicados a los tumores de alto riesgo han permitido ampliar nuestro conocimiento acerca de las implicaciones de las alteraciones genéticas existentes en estos tumores con el mal pronóstico de estos pacientes. Estos hallazgos han servido de base para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo, en la actualidad, de moléculas y abordajes en estudio con prometedores resultados (figura 4).

1.1.7.1. Dianas génicas

Las alteraciones somáticas más conocidas y mejor estudiadas en el neuroblastoma corresponden a la amplificación del oncogén *MYCN*. Aunque existen dificultades para desarrollar mediadores que modifiquen la acción de esta familia de proteínas, se han aislado otras posibles dianas moleculares que intervienen en la cascada regulatoria controlada por *MYCN* y se han diseñado inhibidores específicos que podrían mejorar la eficacia de los tratamientos actuales^(22,27). Dentro de este grupo, encontramos inhibidores de:

- la familia de proteínas BET, responsables de la unión de histonas acetiladas necesarias para la transcripción de genes,
- la ornitina descarboxilasa (ODC), una enzima involucrada en la síntesis de poliaminas,
- la quinasa Aurora A (AURKA), una quinasa de serina/treonina esencial para la estabilización y la protección de la degradación de *MYCN* por el proteosoma.

Además, existen otras mutaciones candidatas a ser reguladas con fines terapéuticos.

Entre ellas encontramos alteraciones en:

- el receptor de tirosina quinasa ALK (*anaplastic lymphoma kinase*), que se encuentran hasta en el 14% de los neuroblastomas de alto riesgo⁽²⁸⁾,
- el receptor de la quinasa B relacionada con la tropomiosina (TrkB), asociadas a neuroblastomas de alto riesgo que presentan mayor índice de angiogénesis, quimiorresistencia y supervivencia tumoral, y que aparece sobreexpresado hasta en el 36% de los pacientes⁽²⁹⁾.

1.1.7.2. Radioterapia

Otras estrategias terapéuticas dirigidas se basan en la radioterapia. El procedimiento más establecido utiliza el radioisótopo metaiodobenzilguanidina marcado con iodo-131 (MIBG-¹³¹) que se dirige al receptor de noradrenalina, sobreexpresado hasta en el 90% de los neuroblastomas⁽³⁰⁾. Existen otras alternativas en desarrollo que se basan en la utilización del radioisótopo DOTA-TATE (1,4,7,10 -tetraazacyclododecane,1,4,7,10 – tetraacetic acid – DOTA; Tyr3-octreotate – TATE) un análogo de la somatostatina dirigido contra el receptor de serotonina, expresado frecuentemente en tumores neuroendocrinos⁽³¹⁾, y cuyo uso podría ser efectivo en el tratamiento de tumores que no expresan el receptor de noradrenalina o que desarrollan resistencia al tratamiento con MIBG-¹³¹.

1.1.7.3. Inmunoterapia

Las técnicas de inmunoterapia abarcan, principalmente, dos tipos diferentes: los anticuerpos monoclonales y las células T con receptores de antígeno quimérico (CAR, de sus siglas en inglés *chimeric antigen receptor*).

Por un lado, encontramos los anticuerpos monoclonales contra el disialogangliósido (GD2). El GD2 es un antígeno glicolipídico de superficie localizado en la membrana celular y que interviene en procesos de adhesión y comunicación celular involucrados en diferenciación y reparación celular. En condiciones fisiológicas, su expresión está restringida a células del sistema nervioso central, neuronas periféricas y melanocitos⁽³²⁾, identificándose también altos niveles de GD2 en las células de los neuroblastomas⁽³³⁾. La utilización de anticuerpos monoclonales anti-GD2 en combinación con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), interleuquina-2 (IL-2) e isotretinoína ha demostrado aumentar tanto la SLE a 2 años ($66\% \pm 5\%$ vs. $46\% \pm 5\%$; $p = 0,01$) como la SG a 2 años ($86\% \pm 4\%$ vs. $75\% \pm 5\%$; $p = 0,02$) en pacientes con tumores de alto riesgo, siendo actualmente parte de su tratamiento estándar^(22,25).

Por otra parte, además del desarrollo de anticuerpos monoclonales, en los últimos años ha crecido el interés en la posible utilidad de las células T CAR. En este sentido, se han desarrollado células T CAR específicas contra GD2 que han demostrado su eficacia al producir una remisión completa del tumor en un 27% de los pacientes tratados⁽³⁴⁾. Estos resultados han alentado esta vía de tratamiento y actualmente existen varios ensayos clínicos analizando la

efectividad de células T CAR de segunda y tercera generación contra GD2 así como contra otros antígenos⁽³⁵⁾.

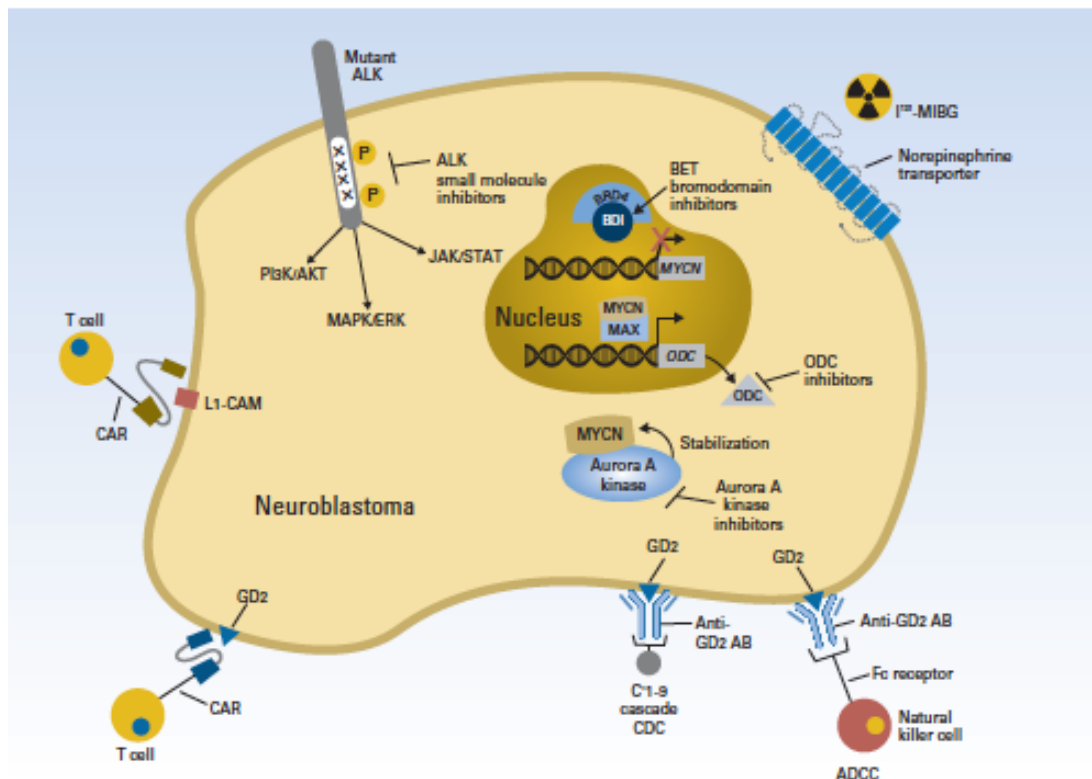


Figura 4. Moléculas y abordajes en estudio como nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de los neuroblastomas de alto riesgo⁽²²⁾.

1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL CÁNCER

La capacidad inmunogénica de las células tumorales no constituye una idea reciente. Los primeros estudios que plantearon esta hipótesis se remontan a principios del siglo XX, cuando Paul Ehrlich en su artículo “Sobre el Estado Actual de la Investigación del Carcinoma” (1909) propuso la idea del control del sistema inmune sobre el crecimiento de estos tumores⁽³⁶⁾. Sin embargo, debido a la falta de conocimientos y desarrollo de la Inmunología en esa época, esta línea de investigación quedó abandonada hasta la década de los 50, momento en el que los trabajos llevados a cabo por Lewis Thomas relacionados con el rechazo de aloinjertos aportaron nuevas evidencias sobre la posible existencia de diferencias antigénicas entre las células sanas y las células tumorales. Estos hallazgos supusieron la base para el desarrollo de investigaciones posteriores que permitieron la formulación de la hipótesis denominada *Vigilancia Inmunológica* como se describe a continuación⁽³⁷⁾.

1.2.1. Primeras teorías: la hipótesis de la *Vigilancia Inmunológica*

Los descubrimientos realizados por George Klein durante la década de los años 60 mediante trasplante de tumores en modelos murinos pusieron de manifiesto la existencia de “antígenos específicos tumorales” que podían desempeñar un papel importante en la generación de una respuesta inmune del organismo frente a las neoplasias y, que a su vez, podían tener un potencial uso en la prevención y tratamiento de tumores⁽³⁸⁾. Por otra parte, basándose en las investigaciones sobre el rechazo de aloinjertos, Lewis Thomas promulgó la idea de que la función del sistema inmune contra el cáncer consistía en proteger al organismo frente a la enfermedad neoplásica manteniendo una homeostasis tisular⁽³⁹⁾. Englobado en este marco conceptual, en 1970, Macfarlane Burnet enunció la hipótesis de la *Vigilancia Inmunológica* en la que se planteaba “una necesidad evolutiva de la mayoría de los animales vertebrados de sangre caliente, la existencia de mecanismos para la eliminación o inactivación de potenciales células mutantes dañinas”, considerando que dichos mecanismos debían ser “de carácter inmunológico”⁽³⁷⁾. En este contexto, los linfocitos actuarían como agentes centinela con capacidad para reconocer y eliminar las células transformadas.

Diferentes experimentos trataron de demostrar esta teoría. Entre ellos, destacan los trabajos llevados a cabo por Osias Stutman en ratones “nude” cuyos resultados, sin embargo, no demostraron diferencias estadísticamente significativas en la formación de tumores, tanto espontáneos como inducidos químicamente, en comparación con ratones *wild type*^(40,41). La falta de evidencia científica en relación a estas investigaciones, corroborada por otros grupos de trabajo, frenó el desarrollo de esta línea de investigación sobre la *Vigilancia Inmunológica* en los años posteriores.

1.2.2. Inmunoección del cáncer

Desde los años 80, el campo de la Inmunología ha sufrido un gran avance. El mayor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inmune, como el descubrimiento de las células T *natural killer* o NK; la constatación de una mayor susceptibilidad al cáncer en modelos murinos con disfunciones del sistema inmune; o la evidencia epidemiológica procedente de los registros poblacionales sobre la predisposición a desarrollar tumores en pacientes inmunodeficientes o inmunodeprimidos, permitieron ampliar el concepto propuesto por M. Burnet y ayudaron a establecer una base científica más sólida sobre la idea de la Inmunovigilancia en los procesos de carcinogénesis. El retomado interés por esta hipótesis

generó nuevas investigaciones sobre las funciones del sistema inmune durante el desarrollo de los tumores y sus interacciones con su microambiente en relación a su influencia en la eliminación o inactivación del cáncer, mediante el ataque a las células tumorales con mayor inmunogenicidad, obviando las menos inmunogénicas y generando un proceso de impresión o esculpido. De esta manera, dichos avances sentaron las bases actuales sobre el papel del sistema inmune en el control del crecimiento tumoral, iniciados por Gavin Dunn y Robert D. Schreiber a partir del año 2002 y que han dado lugar a los conceptos de *Inmunoedición* y *Ciclo Inmunológico del Cáncer*, vigentes y muy desarrollados en la actualidad (figura 5)⁽⁴²⁾.

Según la teoría de la *Inmunoedición*, durante los procesos de tumorigénesis, el sistema inmune ejercería una función reguladora sobre el crecimiento tumoral según las distintas fases de Eliminación, Equilibrio y Escape (procesos conocidos como las “3 Es”). Inicialmente, existiría una situación de lucha contra el tumor (estado antitumoral) que, posteriormente podría progresar a un crecimiento controlado del tumor para, finalmente, alcanzar una fase de progresión tumoral (estado protumoral) de los clones de células tumorales “editados” en respuesta a ese ataque inmune en presencia de mecanismos de tolerancia inmune⁽⁴³⁾.

En una primera fase, el sistema inmune respondería a las señales de “peligro” e inflamatorias del microambiente tumoral: citoquinas proinflamatorias, moléculas derivadas de la muerte celular tumoral y tisular (DAMPs, de sus siglas en inglés *damage-associated molecular pattern*), y moléculas expresadas en la superficie de las células tumorales^(44–46).

De esta manera, mediante el reclutamiento de células de la inmunidad innata como células dendríticas, NK, NKT, macrófagos o linfocitos T $\gamma\delta$ y la liberación de citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras, se establecería un microambiente favorable para el desarrollo de una respuesta inmune “memoria” o adaptativa específica, con acción antitumoral mediante la expansión de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, que daría lugar a la destrucción de las células que han sufrido una transformación maligna.

Los clones tumorales supervivientes entrarían en la denominada fase de Equilibrio, en la cual el sistema inmune mantendría al tumor en un estado de latencia. En esta etapa en la que las células tumorales no son del todo eliminadas, pero tampoco se aprecia un crecimiento tumoral significativo, aparecerían variedades celulares mutadas capaces de evadir al sistema inmune. Es la fase de cáncer “durmiente”, favorecida por una respuesta inmunidad adaptativa mediante la activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y las moléculas IL-12 e INF- γ .

Finalmente, en la fase de Escape, el tumor evadiría el control inmune antitumoral dando lugar a una fase de tolerancia en un ambiente de inmunosupresión que permite el crecimiento tumoral progresivo local y metastásico.

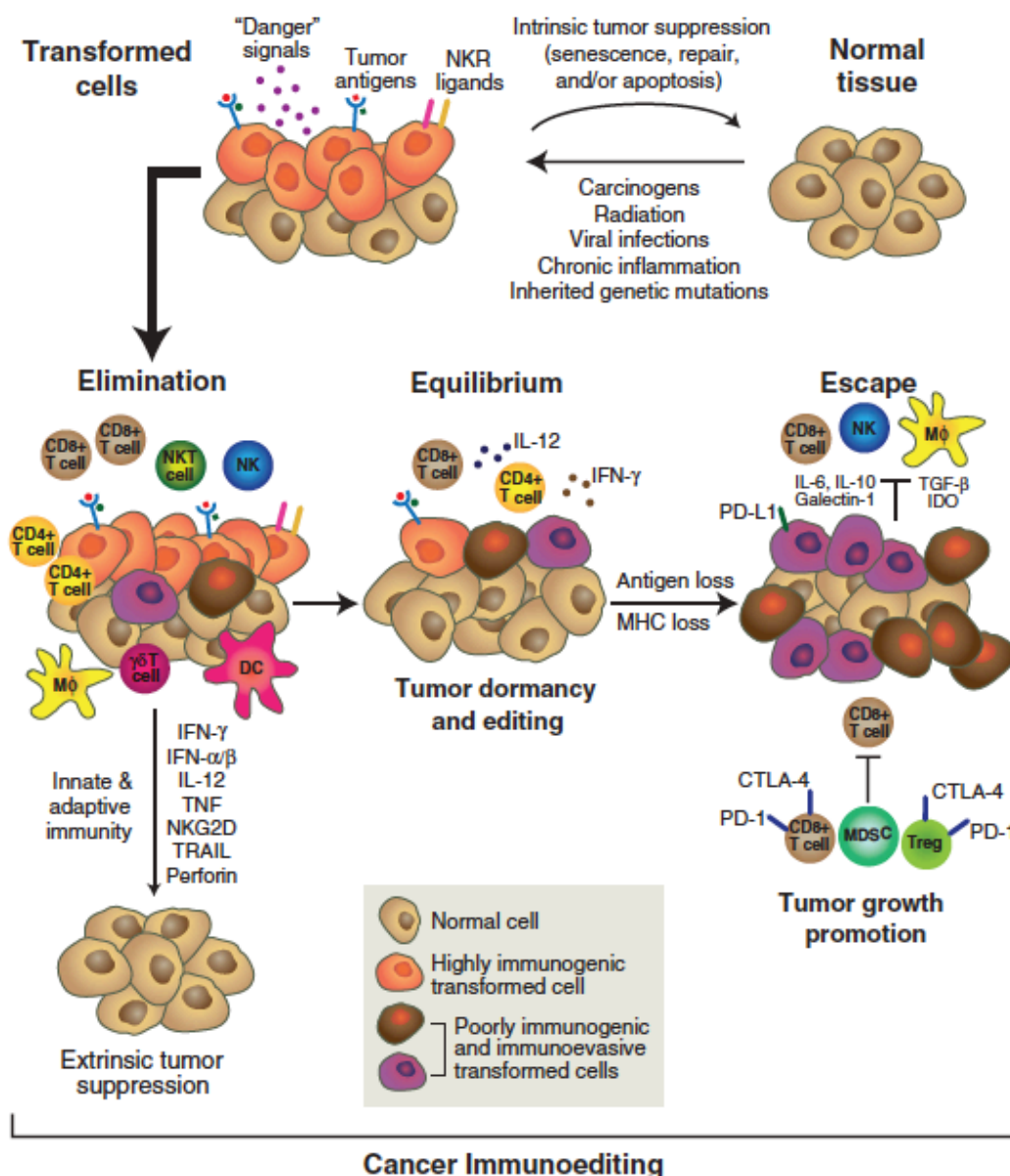


Figura 5. Modelo propuesto por el Dr. Schreiber sobre la inmunoedición del cáncer⁽⁴³⁾.

Esta situación de *tolerancia inmune*⁽⁴⁷⁾ está mediada por diferentes mecanismos moleculares que incluyen la pérdida de antigenicidad tumoral, el incremento de la resistencia a los efectos citotóxicos inmunes, el establecimiento de un estado inmunosupresor en el microambiente tumoral (tabla V):

Pérdida de antigenicidad tumoral
- Disminución de la expresión de antígenos tumorales.
- Ausencia de expresión de proteínas del CMH tipo I.
- Imposibilidad del procesamiento intracelular de los epítomos.

Incremento de la resistencia a los efectos citotóxicos
- Inducción de inhibidores apoptóticos (BCL-2).
- Aumento de factores de transcripción pro-oncogénicos (STAT3).
- Expresión de moléculas de superficie destructoras de células T citotóxicas (PD-L1 o FasL).
Establecimiento de un estado inmunosupresor en el microambiente tumoral
- Producción de citoquinas inmunosupresoras (VEGF, IL-10, TGF- β e IDO).
- Incremento de poblaciones células inmunosupresoras (células T _{reg} , MDSCs y macrófagos con fenotipo M2) con efector inhibidor sobre los linfocitos T antitumorales.
- Aumento de moléculas inhibidoras de la activación y expansión de los linfocitos (CTLA-4) o de la acción citotóxica de las células inmunes en el lecho tumoral (PD-1; PD-L1; LAG-3).

Tabla V. Mecanismos de tolerancia inmune en los fenómenos de crecimiento tumoral.

Este ambiente inmunosupresor tiene un efector inhibidor de la función de los linfocitos T específicos anti-tumorales^(48–50), y constituye un complejo modelo de interacciones en los puntos clave de los procesos de inmunomodulación del cáncer (“check points”) ^(51–55).

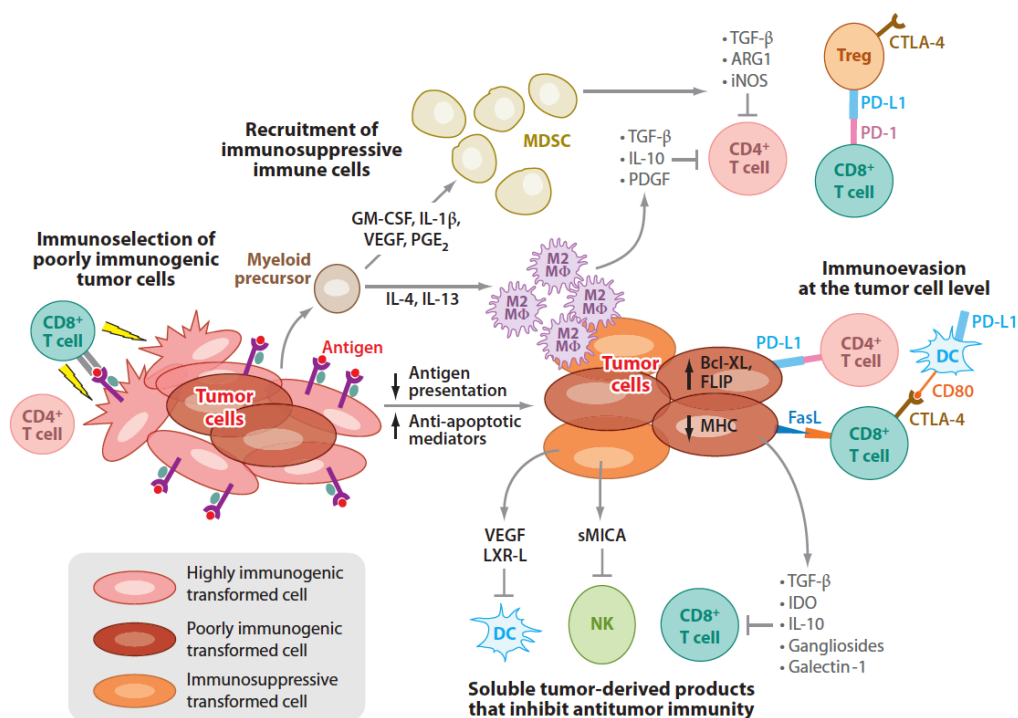


Figura 6. Escape tumoral: mecanismos celulares y moleculares de tolerancia inmunológica⁽⁵⁵⁾.

1.2.3. Infiltrado inmune intratumoral: los Linfocitos Infiltrantes de Tumor

En la última fase de escape, el tumor contiene un complejo infiltrado celular que incluye células hematopoyéticas, estromales y endoteliales. El infiltrado inmune se compone de diversos tipos de linfocitos, células NK, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos⁽⁵⁶⁾. Dentro de estas poblaciones, destaca principalmente la presencia de macrófagos (de los subtipos M0/M1/M2) y células T $\alpha\beta$ (que incluyen células CD4⁺ memoria, CD4⁺ reguladoras, CD4⁺ auxiliares foliculares y CD8⁺ efectoras). El infiltrado por células B, monocitos, células dendríticas, NK, células T $\gamma\delta$ y mastocitos es minoritario, mientras que neutrófilos y eosinófilos aparecen de manera variable⁽⁵⁷⁾.

Los primeros datos sobre la existencia de leucocitos en muestras de tumor datan del año 1863, de las descripciones del patólogo alemán Rudolf Virchow. Inicialmente, se pensó que estas células presentes en procesos inflamatorios crónicos podían favorecer la aparición del cáncer. Sin embargo, en los años posteriores, diferentes estudios epidemiológicos e investigaciones en modelos preclínicos demostraron una correlación positiva entre la infiltración tumoral por estas células y un pronóstico favorable, dando lugar al concepto del papel protector del sistema inmune como mecanismo de defensa contra el cáncer^(58,59). Wallace Clark en 1969 definió los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs: *tumor-infiltrating lymphocytes*) como aquellas células del sistema inmune involucradas en la respuesta del huésped contra el cáncer^(60,61).

Los TILs constituyen una población heterogénea de células T $\alpha\beta$ que incluyen subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (reguladoras y efectoras) y células NK, que forman junto con otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y MDSCs el infiltrado tumoral. Las células T antitumorales presentan de forma característica una mayor expresión de moléculas inhibitoras junto a una disminución de la expresión de receptores de citoquinas, lo que conlleva una pérdida de la producción de citoquinas efectoras, representativo del denominado estado de “agotamiento” de las células T en el microambiente tumoral^(59,62). Actualmente, los TILs se han identificado no sólo en los tumores primarios, sino también en ganglios linfoides y metástasis a distancia de diferentes tipos de cáncer^(60,61).

De esta manera, es conocido que los TILs CD4⁺ y CD8⁺ expresan niveles de PD-1 mayores que las células T de la sangre periférica y de los tejidos normales y que esta expresión aumentada de PD-1 en las células T antitumorales contribuye a la alteración de la respuesta inmune frente al cáncer⁽⁶³⁾. Además, estas células también presentan niveles altos de CTLA-4, LAG-3, TIM-3,

ausencia de expresión de CD25, IL-7R α , y una reducción significativa de la producción de IFN- γ (figura 7)^(59,64).

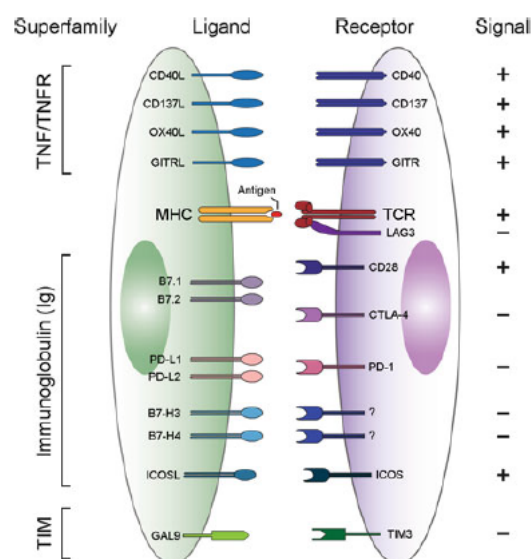


Figura 7. Perfil fenotípico de los TILs. En morado se representa una célula T con las diferentes moléculas inhibidoras: PD-1, CTLA-4, LAG3 y TIM3⁽⁵⁹⁾.

La asociación entre la presencia de TILs y una supervivencia mayor en pacientes con cáncer frente aquellos que presentaban tumores sin este infiltrado fue reconocida por Maccarty en 1922⁽⁶⁵⁾. Tras la demostración por el Dr. Rosenberg del potencial terapéutico de estas células en ratones durante los años 80⁽⁶⁶⁾, una gran cantidad de estudios clínicos en humanos confirmaron la presencia de TILs en tumores resecados con capacidad de reconocimiento específico contra células tumorales autólogas⁽⁶⁷⁾. Esto se ha traducido en que la presencia de linfocitos, especialmente células T, se ha identificado como un factor de buen pronóstico en muchos cánceres como el melanoma, cáncer de mama, de ovario, linfomas, diferentes subtipos de tumores de cabeza y cuello, pulmón, esófago o carcinoma urotelial⁽⁵⁷⁾. Además, recientes estudios en melanoma, el tumor más ampliamente investigado en este campo, han mostrado por secuenciación de nueva generación (NSG, del inglés *next-generation sequencing*) que este infiltrado compuesto por subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ basa su especificidad en el reconocimiento de neoantígenos tumorales. Estos neoantígenos podrían tratarse de alteraciones genómicas codificadas por las células tumorales como péptidos mutados por sustitución de aminoácidos que son presentados por moléculas del MHC⁽⁶⁸⁾.

Toda esa evidencia científica apoya que la respuesta inmune desarrollada en el tumor en la fase de eliminación promueve el infiltrado por células que interaccionan entre ellas para organizar y controlar una defensa antitumoral antígeno específica. Un modelo posible de estas

interacciones defiende que los TILs podrían reconocer dichos neoantígenos y activarse en estructuras linfoides terciarias en la vecindad de los tumores debido al estado inflamatorio que produce el propio tumor. De esta manera, se generarían células efectoras y memoria que podrían migrar a órganos linfoides secundarios, circular por la sangre periférica con el objetivo de controlar la diseminación de células tumorales o migrar a las metástasis en desarrollo⁽⁵⁷⁾.

Por último, como hemos visto previamente, los TILs son disfuncionales dentro del microambiente tumoral debido a la expresión de múltiples proteínas inhibitoras como CTLA-4 (CD152), PD-1 (CD279), TIM-3 y LAG-3⁽⁶⁹⁾. Estas moléculas nos permiten reconocer por citometría de flujo a los TILs y son la base del actual abordaje terapéutico mediante inhibidores de las proteínas de control o *checkpoint*.

1.2.4. TILs en el tratamiento contra el cáncer: la terapia celular adoptiva

En 1964 el Dr. P. Alexander publicó el primer trabajo acerca de la utilización de TILs en el tratamiento del cáncer en ratas⁽⁷⁰⁾. Nació así el concepto conocido actualmente como terapia celular adoptiva (ACT, del inglés *adoptive cell therapy*). Sin embargo, la falta del conocimiento suficiente para aislar y expandir dichas células impidió el uso de éstas como terapia hasta los años 80. El trabajo del Dr. S. Gillis publicado en 1977 estableció las bases para el cultivo de TILs⁽⁷¹⁾, pero, sin embargo, fueron los resultados del Dr. Steve Rosenberg los que abrieron el camino para la utilización de los TILs como herramienta terapéutica al desarrollar un método de expansión *in vitro* de linfocitos aislados de muestras tumorales de ratones al cultivarlos con IL-2, que podían utilizarse de forma eficaz para el tratamiento del cáncer avanzado en ratones⁽⁶⁶⁾. De esta manera, en 1988 el grupo del Dr. Rosenberg comunicó los resultados de un ensayo clínico en fase I en el que trató a 12 pacientes con tumores refractarios de diferentes tipos histológicos con TILs obtenidos a partir de metástasis resecadas y cultivados con altas dosis de IL-2. De los 12 pacientes, dos presentaron respuesta al protocolo que incluía la infusión de TILs junto con IL-2, demostrando por primera vez el papel terapéutico de los TILs⁽⁷²⁾.

En líneas generales, podemos dividir el desarrollo de la ACT en tres generaciones (figura 8)⁽⁷³⁾. Una primera fase en la que se utilizaron linfocitos T policlonales con baja especificidad, seguido de una segunda fase en la que se comienzan a usar TILs con una gran especificidad por las células tumorales, pero que requieren de un complejo proceso para su obtención para, finalmente, en la última fase mediante la aplicación de ingeniería genética producir células T modificadas con receptores específicos antitumorales (CAR o TCR).

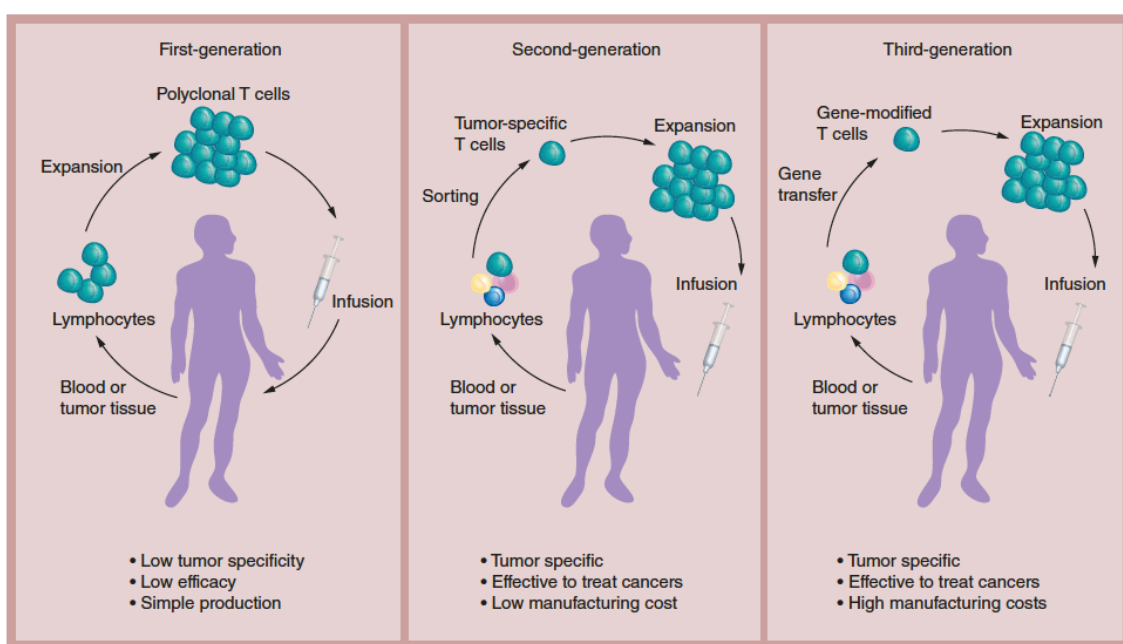


Figura 8. Generaciones de ACT mediante la utilización de células T⁽⁷³⁾.

1.2.4.1. IL-2, células NK y LAK

En una primera fase, el descubrimiento del papel de la IL-2 como estimulador de sistema inmune promovió la búsqueda de mediadores celulares que permitieran la regresión tumoral. La utilización de células NK y LAK (*lymphokine-activated killer*) en combinación con IL-2 constituyó el primer abordaje de ACT, pero debido a su falta de especificidad demostró una efectividad limitada^(74–76).

1.2.4.2. TILs, clones de células T primadas por APC y células T citotóxicas 4-1BB

Posteriormente, el reconocimiento de los TILs como mediadores específicos antitumorales más potentes que las células LAK llevó a explorar la utilización de dichas células como ACT. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos, principalmente en melanoma, en los que se han explorado las mejores condiciones para optimizar los resultados de este tratamiento (tabla VI)⁽⁷⁷⁾.

Reference	Histology	Patients (n)	Response ⁺			Significance
			OR (%)	CR (%)	PR (%)	
Rosenberg et al, 1988	Melanoma	20	11 (55%)	1 (5%)	10 (50%)	First in human trial (TILs + IL-2)
Dudley et al, 2005	Melanoma	43	21 (49%)	5 (12%)	16 (37%)	Pre-conditioning regimen to improve TIL engraftment using "modern-era" lymphodepletion (NMA) and high dose interleukin-2 (IL-2)
Dudley et al, 2008		25 (2 Gy TBI)	13 (52%)	5 (20%)	8 (32%)	In sequential trials, response rate directly proportion to depth of pre-conditioning lymphodepletion, prompting evaluation in a randomized trial.
Rosenberg et al, 2011		25 (12 Gy TBI)	18 (72%)	10 (40%)	8 (32%)	
Dudley et al, 2010	Melanoma	33 (NMA)	19 (58%)	3 (9%)	16 (49%)	Minimally cultured CD8-enriched TILs can mediate effective tumor regression.
		23 (6 Gy TBI)	11 (48%)	2 (9%)	9 (39%)	
Itzhaki et al, 2011	Melanoma	31	15 (48%)	4 (13%)	11 (35%)	Minimally cultured bulk TILs can mediate effective tumor regression.
Pilon-Thomas et al, 2012	Melanoma	13 ^a	5 (38%)	2 (15%)	3 (23%)	Bulk TIL screened for IFN- γ secretion can mediate durable tumor regression.
Radvanyi et al, 2012	Melanoma	31	13 (42%)	2 (6%)	11 (35%)	TIL, particularly differentiated effector cells (CD8+/BTLA+) can mediate durable tumor regression.
Ellebaek et al, 2012	Melanoma	6 ^b	2 (33%)	2 (33%)	0	Complete and durable responses were induced after TIL treatment using NMA in combination with low-dose IL-2
Besser et al, 2013	Melanoma	80 ^c	23 (29%)	5 (6%)	18 (23%)	Complete and durable responses with NMA TIL. First intent-to-treat analysis, demonstrating a 29% drop-out rate, mainly due to disease progression
Tran et al, 2014	Cholangiocarcinoma	1	1 (100%)	-	1 (100%)	First successful treatment of a solid epithelial cancer using TILs targeting a mutated antigen.

⁺ As measured by WHO or RECIST criteria

^a An additional 6 patients resected, but not treated

^b An additional 5 patients resected, but not treated

^c 23 (29%) patients enrolled, but not treated

Tabla VI. Experiencia clínica en la utilización de ACT con TILs en tumores sólidos⁽⁷⁷⁾.

La experiencia clínica acumulada ha permitido clarificar una serie de aspectos relacionados con el resultado del tratamiento con TILs:

- Un régimen preparatorio que genere una linfodepleción muy profunda en el paciente es necesario para mejorar los índices de respuesta⁽⁷⁸⁾.
- El número total de TILs infundidos y el número total de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) infundidos son factores directamente asociados a la respuesta clínica⁽⁷⁹⁾.
- El periodo de tiempo de cultivo *ex vivo* de los TILs debe ser el más corto posible⁽⁸⁰⁾.

Existen todavía controversias no resueltas sobre el papel de otros factores relacionados con los TILs y la respuesta clínica:

- Es desconocido el rol de los linfocitos T CD4. Algunos trabajos han sugerido un posible papel negativo. Un ensayo clínico en el que se eliminaron los TILs CD4 del inóculo no mostró mejores resultados⁽⁸¹⁾, aunque la eliminación de los linfocitos CD4 no distinguió entre los CD4 reguladores y los CD4 efectores.
- Algunos autores han relacionado el estado de diferenciación de los TILs con la respuesta, pero los resultados son dispares entre grupos. No todos los trabajos han relacionado el inmunofenotipo con la funcionalidad, por lo que estos resultados no son comparables en todos los casos, y es posible que los marcadores clásicos de

diferenciación de los linfocitos T no se correspondan fielmente en el caso de los TILs cultivados con dosis muy altas de IL-2 durante varias semanas.

- No se conoce el papel de la administración de IL-2 tras la infusión de los TILs, la dosis y pauta óptimas, ni tan siquiera si es absolutamente necesaria⁽⁸²⁾.

Además, existen otras formas de ACT con células T naturales obtenidas de sangre periférica como son la generación de clones de células T antígeno-específicos antitumorales mediante su co-cultivo con células presentadoras de antígeno (APC, de sus siglas en inglés *antigen presenting cells*) pulsadas con péptidos⁽⁸³⁾ o tras selección y expansión de células T citotóxicas 4-1BB⁽⁸⁴⁾. La principal desventaja de la generación de clones específicos mediante estas dos últimas técnicas consiste en el reconocimiento de un único antígeno diana, por lo que su eficacia es menor respecto a la terapia con TILs en la que los linfocitos T son capaces de reconocer múltiples antígenos⁽⁷³⁾. En cuanto a los TILs, aunque son sensibles a una mezcla de diferentes antígenos tumorales y, por tanto, tienen una mayor eficacia, los protocolos actuales de ACT contemplan la necesidad de obtener tejido tumoral como fuente de los mismos, lo que conlleva procedimientos quirúrgicos invasivos⁽⁷³⁾.

1.2.4.3. Células T CAR y TCR

Dada la dificultad para aislar y expandir un número suficiente de TILs para su utilización como ACT, se han desarrollado estrategias de inmunoterapia basadas en la modificación genética de células T para reconocer células tumorales por vía del receptor de la célula T (TCR, de sus siglas en inglés *T cell receptor*) o por adición de un CAR. Los TILs reconocen antígenos peptídicos específicos de las células tumorales presentados por APC en el contexto de moléculas del MHC y determinados segmentos de la región hipervariable de la subunidad β del TCR. Este reconocimiento produce una activación de los TILs, generando una expansión clonal de linfocitos única y específica contra diferentes antígenos asociados a tumor (TAAs, de sus siglas en inglés *tumor-associated antigens*)⁽⁸⁵⁾. Los TCR son clones de linfocitos T que se dirigen contra dianas tumorales específicas pero cuya acción está restringida por el MHC y tan sólo permite reconocer antígenos peptídicos. Por el contrario, los CAR se componen de un anticuerpo derivado de un fragmento variable de cadena única (scFv, de sus siglas en inglés *single chain variable fragment*), lo cual le confiere la especificidad, asociado a la cadena ζ del CD3. Esta estructura permite el reconocimiento de antígenos no peptídicos y es independiente de la presentación por el MHC⁽⁸⁶⁾.

1.2.5. Los TILs y la terapia celular adoptiva en el tratamiento del neuroblastoma

Actualmente, existe una amplia evidencia de la presencia de una respuesta inmune antígeno específica frente al cáncer^(36–39,42,43,57). En el caso del neuroblastoma, los primeros indicios de la existencia de esta respuesta inmune fueron reportados por I.E. Hellström y Alexander H. Bill a finales de los años 60 al demostrar la presencia de leucocitos en tumores primarios de neuroblastoma y comprobar que los linfocitos obtenidos de estas muestras tumorales de niños con neuroblastoma inhibían la formación de colonias de células neuroblásticas^(87–89). Sin embargo, la caracterización fenotípica y funcional de los TILs en este tumor no fue estudiada hasta casi 30 años después. Por un lado, el grupo del Dr. Vito Pistoia describió la presencia de TILs tanto CD4 como CD8 obtenidos de tumores de pacientes, con capacidad de expresar IFN γ , IL-4, IL-5, TNF α , IL-8, IL-10, de expandirse en cultivo con IL-2 y con actividad citotóxica frente a líneas tumorales⁽⁹⁰⁾. Por otra parte, otro estudio corroboró la capacidad citolítica de los TILs frente a células tumorales de neuroblastoma⁽⁹¹⁾. Además, la presencia intratumoral de estas células linfoides en una muestra extensa de niños con neuroblastoma se asoció con un pronóstico más favorable⁽⁹²⁾. Sin embargo, los primeros intentos llevados a cabo para su utilización y aplicación clínica obtuvieron resultados negativos al mostrar que los TILs presentaban una pobre viabilidad y especificidad con la consecuente dificultad para expandir estas células en un momento en el que la tecnología se encontraba en sus fases más preliminares⁽⁹³⁾. Este hecho provocó el abandono de esta vía de investigación en favor de otras estrategias de inmunoterapia para el tratamiento de tumores sólidos pediátricos como son las células T CAR, TCR o la ACT con células NK asociada a anticuerpos monoclonales antiGD2^(86,94,95). Sin embargo, actualmente existe una mejor caracterización inmunofenotípica de los TILs, con un aumento del conocimiento acerca de su capacidad funcional y una optimización de las técnicas para su identificación, aislamiento y expansión. Además, la terapia con TILs ha demostrado su efectividad terapéutica en el melanoma, con unas tasas de curación completa a más de 5 años del 20%⁽⁹⁶⁾, en una enfermedad mortal con cualquier otro tratamiento. Sin embargo, a pesar de compartir un origen embriológico común con los melanocitos, son escasos los trabajos publicados actualmente que hayan investigado el potencial terapéutico de los TILs en el caso del neuroblastoma.

1.2.6. Avances recientes en el uso de TILs: la biopsia líquida

Una de las razones de la falta de desarrollo en el uso de TILs para el tratamiento de tumores sólidos como el neuroblastoma es que para aislar y expandir estas células se requiere

de procedimientos invasivos para la obtención de tejido tumoral⁽⁸⁶⁾. Así como en pacientes con melanoma metastásico el acceso a lesiones primarias o metastásicas no representa una limitación, en el caso de otros tumores se necesita de un procedimiento quirúrgico para obtener dicho material de partida, muchas veces en un paciente que se encuentra en malas condiciones para la agresión que supone una intervención quirúrgica. Además, al tratarse de tratamientos experimentales, sin poder garantizar un resultado positivo, muchas veces es difícil justificar dicho acto quirúrgico. La búsqueda de fuentes alternativas para la fabricación de esta terapia es, por tanto, muy necesaria. En los últimos años, la comprobación de la existencia de TILs circulantes en sangre periférica en pacientes con tumores sólidos ha abierto la posibilidad de evitar procedimientos quirúrgicos para obtener el material de inicio para la fabricación de esta terapia⁽⁹⁷⁻¹⁰²⁾. El trabajo llevado a cabo por Gros y cols. demostró la posibilidad de aislar linfocitos T antitumorales de la sangre de pacientes con melanoma mediante la identificación de células PD1⁺ circulantes⁽⁹⁹⁾. Este hallazgo ha sido confirmado en otros tumores gastrointestinales o en el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM)^(97,98,103,104). Aunque dicha subpoblación constituye una escasa proporción de los linfocitos circulantes, no cabe duda de la potencialidad de esta vía no sólo para el aislamiento, expansión y posterior reinfusión de estas células como ACT, sino también como una fuente de información para el estudio e identificación de linfocitos T frente a antígenos específicos tumorales mediante secuenciación masiva del TCR, proporcionando de esta manera un método no invasivo alternativo a los procedimientos quirúrgicos necesarios actualmente (figura 9)^(105,106).

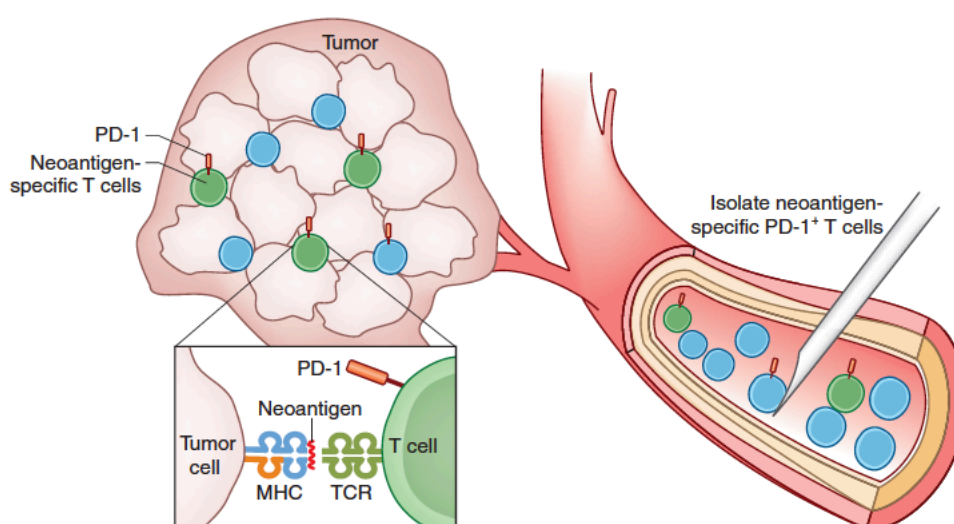


Figura 9. Representación de la hipótesis de la “biopsia líquida”: escenario en el que a partir de una muestra sanguínea se podrían aislar clones de linfocitos T antitumorales mediante estudio de las subpoblaciones PD-1⁺ circulantes en sangre periférica⁽¹⁰⁶⁾.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe aún un elevado porcentaje de pacientes pediátricos con neuroblastomas de alto riesgo con mal pronóstico que presentan resistencia a los tratamientos disponibles con múltiples fármacos quimioterápicos y diferentes esquemas de radioterapia. Es por ello que son muy necesarias opciones terapéuticas novedosas que eviten a estos pacientes un desenlace infausto. La aparición de nuevas estrategias de inmunoterapia como la ACT para el tratamiento de tumores sólidos se presenta como una nueva opción terapéutica que podría mejorar los resultados de esta población. Aunque existen numerosos ensayos clínicos en tumores típicos de la edad adulta como, por ejemplo, el melanoma, son pocas las vías que han explorado su potencial terapéutico en tumores infantiles.

El grupo del Dr. Ramírez Orellana ha desarrollado varios proyectos para el tratamiento del cáncer infantil utilizando diferentes estrategias de inmunoterapia, incluyendo TILs, con resultados prometedores. Sin embargo, en el caso del neuroblastoma, un tumor retroperitoneal de difícil acceso, la obtención de muestras tisulares para la recuperación de este tipo celular inmune requiere de procedimientos invasivos quirúrgicos. Por ello, la posibilidad de que estas células circulen en la sangre periférica, como se ha demostrado en otros tumores, abre la puerta a evitar estas intervenciones y con ello disminuir la morbilidad a la que están sometidos estos pacientes. No obstante, este componente celular supone un porcentaje muy pequeño del total del conjunto leucocitario en la sangre.

En este trabajo, desarrollamos un modelo murino con la finalidad de comprobar la existencia de TILs circulantes específicos contra el neuroblastoma y conocer si la aplicación de protocolos de movilización de PH podría aumentar este componente celular en la sangre periférica para servir como fuente de dichas células para su utilización en el desarrollo de terapias avanzadas de inmunoterapia.

2.2. HIPÓTESIS

La utilización de un protocolo de movilización de PH con factor estimulante de colonias de granulocitos (Neupogen®) aplicado a un modelo animal consistente en ratones inmunocompetentes portadores de neuroblastoma permitiría aumentar la proporción de TILs en sangre periférica.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivos principales

- Establecer un modelo murino de neuroblastoma con mutación *MYCN* en el que poder estudiar la presencia de TILs en sangre periférica.
- Evaluar si protocolos de movilización de PH de uso clínico aumentan la movilización de TILs desde el tumor a la sangre periférica.

2.3.2. Objetivos secundarios

- Identificar clones de linfocitos T circulantes y TILs mediante secuenciación de la región variable de la subunidad β del TCR, que permita su seguimiento anatómico en animales con neuroblastoma.
- Establecer las condiciones óptimas de cultivo de linfocitos de ratón 129/SvJ para su purificación y expansión *in vitro*.
- Analizar si la movilización de TILs a sangre periférica es funcionalmente relevante como fuente para ACT.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROBLASTOMA EN RATONES INMUNODEFICIENTES: CIRCULACIÓN DE TILs POR EL ORGANISMO

3.1.1. Animales de experimentación

Utilizamos ratones (*Mus musculus*) macho de 12 semanas inmunodeficientes *NOD scid gamma*, que carecen de linfocitos B y T, así como de células NK, y presentan ausencia de ciertas citoquinas y defectos del sistema inmune innato⁽¹⁰⁷⁾. En estos experimentos generamos un modelo de ratón inmunodeficiente para estudiar la posibilidad *per se* de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) de desplazarse por el organismo sin interferencias del sistema inmune adaptativo. En segundo lugar, quisimos comprobar si la aplicación de protocolos clásicos de movilización a sangre periférica en humanos mejoraba esta posibilidad teórica.

Dichos animales se compraron al laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine, EE. UU.). Su cría y mantenimiento se llevo a cabo en la sala de animales inmunodeficientes de las instalaciones del Servicio del Animalario del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) con Número de Registro 28079-21 A, siguiendo y cumpliendo todos los estándares y recomendaciones establecidos para el cuidado y mantenimiento de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos según la Federación Europea de Asociaciones de Laboratorio de Animales en la Ciencia (FELASA, de sus siglas en inglés, *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Se mantuvo a los ratones en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros HEPA, humedad relativa ($55 \pm 15\%$) y temperatura (20 ± 2 °C), con ciclos luz/oscuridad de 12 horas, alimentación *ad libitum* con pienso y bebida con agua irradiada con luz ultravioleta con al menos, 4 partes por millón de cloro residual libre.

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el OEBA (Órgano para Evaluar el Bienestar Animal) en CIEMAT y el Departamento Regional de Madrid de Medio ambiente, con referencia PROEX 186/15.

3.1.2. Línea celular de neuroblastoma

Para la generación de neuroblastomas en el modelo experimental inmunodeficiente se seleccionó la línea celular de neuroblastoma 36769 (NB36769) proveniente de ratones 129/SvJ, con el mismo fondo genético, portadores de neuroblastoma con una mutación del oncogén *MYCN* que condiciona la amplificación del mismo por medio de la presencia del promotor de la tirosina hidroxilasa de rata (TH-*MYCN*)⁽¹⁰⁸⁾. Dicha línea fue cedida por el Profesor Louis Chesler,

oncólogo y responsable del *Paediatric Solid Tumour Biology and Therapeutics* del *Institute of Cancer Research's Clinical Studies Division* en *The Royal Marsden Hospital* de Londres.

Las células tumorales se cultivaron en suspensión con medio DMEM:F12 (1:1) (Gibco™), suplementado con 1xB27 sin vitamina A (Gibco™), mFGF 40 ng/ml (R&D Systems®), mEGF 20 ng/ml (R&D Systems®) y penicilina-estreptomicina 1% (Gibco®) en estufa a 37 °C y 5% CO₂. Las células tumorales, también denominadas neuroesferas por su configuración en forma de esferas cuando se cultivan *in vitro* en suspensión (figura 10), se mantuvieron en frascos de cultivo (EasyFlask™, Thermo Fisher Scientific) a niveles de subconfluencia con renovación del medio cada 3-4 días.

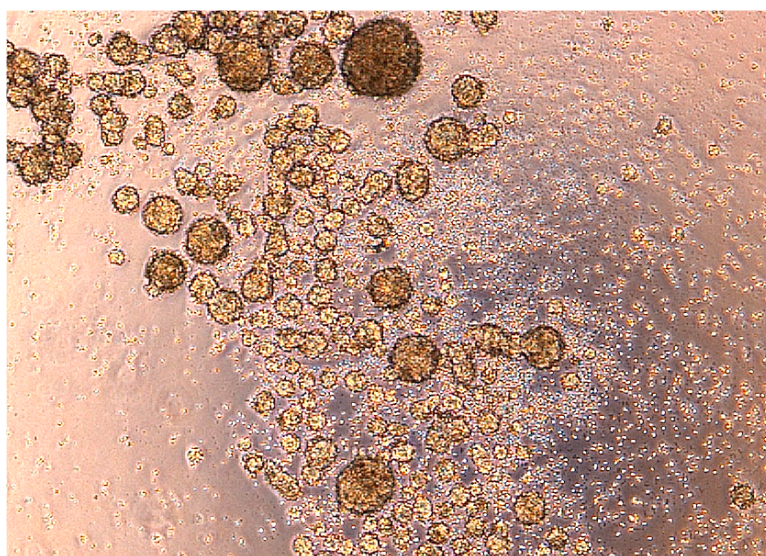


Figura 10. Neuroesferas de la línea celular NB36769 en cultivo *in vitro* en suspensión.

3.1.3. Implante subcutáneo de neuroesferas a ratones *NOD scid gamma*

El procesamiento de los cultivos celulares para la realización del implante en los ratones huéspedes se realizó con el objetivo de obtener suspensiones unicelulares. Para ello, se recogieron los cultivos y se centrifugaron a 900 r.p.m. a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Se añadió tripsina 1x (TrypLE™ Select, Gibco™) al pellet resultante y se incubó a 37 °C, durante 3 minutos. Tras detener la acción de la enzima por dilución con medio, se recentrifugó la muestra a 1200 r.p.m. a temperatura ambiente, durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en medio DMEM:F12 (50%) no suplementado para su conteo con cámara de Neubauer a una dilución 1/2. Finalmente, se prepararon suspensiones celulares de 1x10⁶ neuroesferas en 50 µl de medio no suplementado.

Dichas suspensiones se inyectaron en el tejido celular subcutáneo a nivel de la región dorsal derecha de cada ratón utilizando agujas de 25 G x 5/8".

3.1.4. TILs provenientes de ratones inmunocompetentes portadores de neuroblastoma con la mutación TH-MYCN

Se inocularon, en la misma región donde se realizó la inyección de las células tumorales, suspensiones celulares con 1×10^5 TILs específicos de la misma línea celular (NB36769), obtenidos de neuroblastomas generados mediante el modelo de trasplante ortotópico en ratones 129/SvJ inmunocompetentes⁽¹⁰⁹⁾.

3.1.5. Movilización de TILs por el organismo en el modelo inmunodeficiente

Se inició un protocolo de movilización con Neupogen® (Amgen Europe B.V.) 10 µg/kg/dosis cada 12 horas, hasta un total de 10 dosis en 5 días, mediante inyección subcutánea en ambos flancos, de forma alterna, con aguja de 25 G x 5/8".

3.1.6. Sacrificio

El sacrificio se realizó tras completar el protocolo de movilización. Inicialmente, bajo anestesia general con ketamina a 50 ng/g de peso, se realizó la exanguinación del animal mediante punción cardíaca o sección de la vena axilar en bolsón cutáneo. Tras la exanguinación se completó la eutanasia del animal mediante dislocación cervical. Mediante laparotomía transversa supraumbilical izquierda se extirpó el bazo.

3.1.7. Procesamiento de las muestras de sangre periférica

Se obtuvieron entre 200 y 500 µl de sangre por cada animal. Todas las muestras se conservaron, para su transporte, junto con 50 µl de EDTA 0,5 M, a temperatura ambiente.

El conteo de linfocitos se realizó en cámara de Neubauer con Türk (Merck KGaA) a una dilución 1/10.

Para la lisis del componente eritrocitario se utilizó solución lisante de hematíes sin lavado (Quiclysis™, Cytognos) a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 r.p.m. a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se repitió por segunda vez este procedimiento para minimizar al máximo la contaminación por glóbulos rojos. Posteriormente, las células fueron

lavadas con PBS dos veces y centrifugadas. Tras ello, el pellet resultante se resuspendió en PBS para su estudio por citometría de flujo (FACSCanto™ II, Becton Dickinson).

3.1.8. Procesamiento del bazo

Tras la esplenectomía, se mantuvieron las muestras tisulares en tubos cónicos para centrífuga (Falcon™, Thermo Fisher Scientific) con 10 ml de HBSS 1X (Corning™, Thermo Fisher Scientific).

Los bazos fueron procesados mediante disgregación mecánica sobre un filtro de 40 µm en tubos cónicos con 30 ml de PBS para la suspensión celular. Se realizó el conteo en cámara de Neubauer con Türk a una dilución de 1/10. Finalmente, se utilizó la muestra procesada para su estudio por citometría de flujo.

3.2. MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROBLASTOMA EN RATONES INMUNOCOMPETENTES: MOVILIZACIÓN DE TILs A SANGRE PERIFÉRICA

3.2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) hembra de 12 semanas *wild type* (WT) de la sublínea 129/SvJ, una cepa de ratones especialmente utilizada en la construcción de ratones *knockout*, que se caracteriza por tratarse de una cepa consanguínea cuyos individuos de color blanco son idénticos genéticamente. Esta isogenicidad o igualdad genética permite el intercambio de tejidos como puede tratarse de células del sistema inmune o células tumorales gracias a la histocompatibilidad entre animales singénicos, una característica imprescindible en la creación del modelo experimental que planteamos⁽¹¹⁰⁾.

Dichos animales se obtuvieron del repositorio del National Cancer Institute (Frederick, Maryland, EE. UU.). Su cría y mantenimiento se llevó a cabo en las instalaciones del Servicio del Animalario del CIEMAT con Número de Registro 28079-21 A, siguiendo y cumpliendo todos los estándares y recomendaciones establecidos para el cuidado y mantenimiento de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos según FELASA.

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el OEBA (Órgano para Evaluar el Bienestar Animal) en CIEMAT y el Departamento Regional de Madrid de Medio ambiente, con referencia PROEX 186/15.

3.2.2. Implante de neuroesferas a ratones WT 129/SvJ

Para generar un modelo de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes, se implantaron suspensiones celulares de 4×10^5 neuroesferas en 30 μ l de medio no suplementado mediante inyección ortotópica en la glándula suprarrenal, la localización más frecuente en los niños.

La intervención quirúrgica se llevó a cabo bajo anestesia general mediante inyección intraperitoneal de ketamina a 50 ng/g de peso. Se utilizó analgesia con buprenorfina 0,15 ng/g de peso, intraperitoneal. Como reversor anestésico postquirúrgico se inyectó intraperitonealmente atipamezol a 2,5 ng/g de peso⁽¹¹¹⁾. Los ratones fueron colocados sobre una manta eléctrica durante la intervención para evitar la hipotermia y se aplicó protección ocular mediante colirio oftálmico.

El procedimiento quirúrgico se basó en un abordaje transperitoneal a través de laparotomía transversa supraumbilical izquierda. Una vez se accedió a la cavidad peritoneal, se evisceró el intestino delgado, la cámara gástrica y se desplazó medialmente el bazo para exponer la región suprarrenal izquierda. Se realizó la inyección ortotópica de la suspensión unicelular de neuroesferas a una concentración de $4 \times 10^5/30$ μ l mediante aguja de 25 G x 5/8", comprobándose la formación de un habón. En casos de sangrados capilares puntiformes en el mesenterio o la pared abdominal, se realizaron ligaduras con suturas absorbibles de 7/0. Tras confirmar la ausencia de complicaciones intraoperatorias como hemorragias o lesiones de órganos abdominales, se procedió al cierre de la pared abdominal en dos planos utilizando suturas absorbibles de 5/0 para el plano muscular y suturas absorbibles de 6/0 para el plano cutáneo (figura 11)⁽¹⁰⁹⁾.

La vigilancia postoperatoria inmediata se realizó en la cubeta sobre una manta térmica comprobando la recuperación de los animales. La monitorización clínica postquirúrgica hasta el sacrificio se basó en la comprobación del estado fisiológico y la supervivencia de los animales cada 3 días. Se mantuvo a los ratones en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros HEPA, humedad relativa ($55 \pm 15\%$) y temperatura (20 ± 2 °C), con ciclos luz/oscuridad de 12 horas, alimentación *ad libitum* con pienso y bebida con agua suplementada con antibiótico y paracetamol.

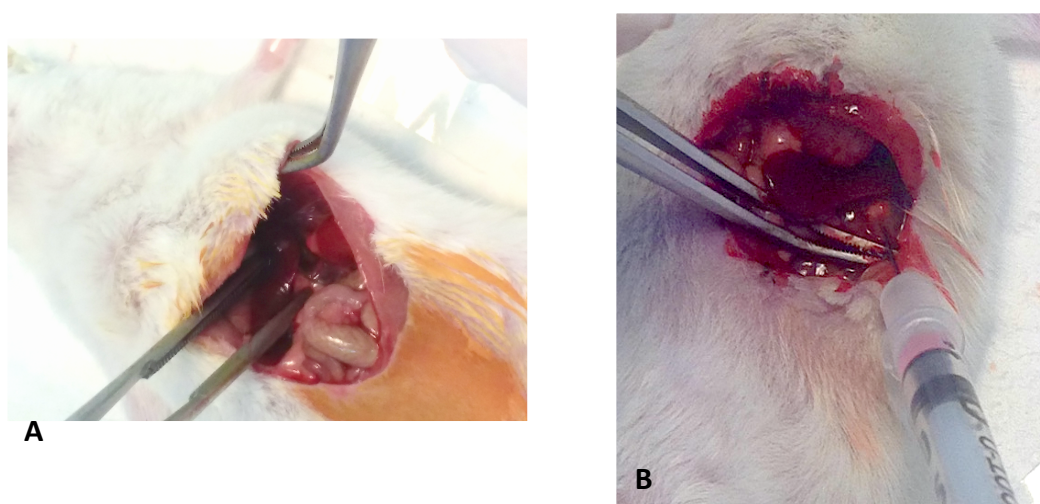


Figura 11. Implante ortotópico de neuroesferas en ratones inmunocompetentes. A) Posición del ratón y exposición del campo quirúrgico. B) Inyección a nivel de la glándula suprarrenal izquierda.

3.2.3. Movilización de TILs a sangre periférica en el modelo experimental

A las 3 semanas del implante de las neuroesferas, se aplicó en los ratones del grupo de intervención un protocolo de movilización de TILs basado en la utilización de G-CSF. En una primera fase, el protocolo se basó en la utilización de Neupogen® a 10 $\mu\text{g/kg/dosis}$ en un volumen de 100 μl , cada 12 horas, durante 5 días, mediante inyección subcutánea con aguja de 25 G x 5/8" en ambos flancos abdominales, de forma alterna (en adelante, protocolo de movilización a bajas dosis). Posteriormente, aumentamos la dosis de Neupogen® a 250 $\mu\text{g/kg/dosis}$ siguiendo el mismo esquema de tratamiento (1 dosis subcutánea cada 12 horas, durante 5 días) y lo denominamos, protocolo de movilización a altas dosis. En la última fase, se realizaron los experimentos utilizando bombas osmóticas (Alzet®) con Neupogen® a una concentración de 0,3 mg/ml por cada bomba con un volumen total de 100 μl . Dichas bombas contienen una dosis equivalente al protocolo de movilización con dosis altas de Neupogen® realizado mediante inyecciones subcutáneas (250 $\mu\text{g/kg/dosis}$) y consta de una duración similar de 5 días (protocolo a altas dosis con bomba osmótica)⁽¹¹²⁾. Para su colocación se realizó una incisión en la región lumbar baja y se introdujeron a través de la misma dos bombas en cada animal, localizándolas en el plano subcutáneo a nivel dorsal (figura 12). Tras su colocación se suturó la herida con sutura no absorbible de 6/0.



Figura 12. Colocación de las bombas osmóticas a nivel dorsal en los ratones movilizados.

3.2.4. Sacrificio

El sacrificio se realizó a las 4 semanas del implante de las neuroesferas y tras 5 días del comienzo del protocolo de movilización en los animales de dicho grupo. Inicialmente, bajo anestesia general con ketamina a 50 ng/g de peso, se realizó la exanguinación del animal mediante punción cardíaca o sección de la vena axilar en bolsón cutáneo. Tras la exanguinación se completó la eutanasia del animal mediante dislocación cervical. Los tumores se recuperaron a través de un abordaje similar por la laparotomía previa mediante extirpación de la glándula suprarrenal izquierda.

3.2.5. Procesamiento de las muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se procesaron de forma similar a lo expuesto en el apartado 3.1.6. Adicionalmente, se congelaron en seco alícuotas de las muestras procesadas para el aislamiento de ADN.

3.2.6. Procesamiento de las muestras tumorales

Tras la exéresis tumoral se mantuvieron las muestras tisulares en tubos cónicos para centrífuga con 10 ml de HBSS 1x.

Los tumores fueron procesados mediante disgregación mecánica con bisturí hasta obtener la textura de un puré. Posteriormente, se realizó una digestión enzimática en tubos cónicos de 15 ml con medio RPMI-1640 (Gibco™) suplementado con colagenasa D (Roche) 1 mg/ml y DNAasa (Pulmozyme®, Roche) 2500 U, a 37 °C con rotor, durante 45 minutos. La digestión enzimática fue inactivada con FBS y las suspensiones celulares filtradas a través de un filtro de 40 µm (Falcon™, Thermo Fisher Scientific). Se centrifugaron las muestras a 1500 r.p.m.

durante 5 minutos, a temperatura ambiente. El pellet resultante se lavó dos veces y se resuspendió en 30 ml de PBS pH 7,2 (Gibco™). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer con Türk a diferentes diluciones según la densidad celular. Tras ello, se congelaron alícuotas en tubos eppendorf de suspensiones celulares en seco para el aislamiento de ADN. El resto de la muestra procesada se utilizó para el estudio por citometría de flujo.

3.3. SECUENCIACIÓN DEL REPERTORIO DE TCR

3.3.1. Purificación de ADN de sangre periférica y muestras tumorales

Se purificó el ADN de suspensiones unicelulares congeladas de las muestras de sangre y tumor provenientes de 6 ratones 129/SvJ WT TH-MYCN trasplantados con neuroesferas NB36769. Tres de estos ratones habían sido sometidos a un protocolo de movilización con altas dosis de Neupogen®.

Se utilizó el kit QIAamp DNeasy para sangre y tejidos (Qiagen N.V.), siguiendo las instrucciones del fabricante (figura 13)⁽¹¹³⁾. En resumen, se realizó la lisis celular y se unió el ADN a una membrana. De esta manera, mediante centrifugación de las muestras en varios pasos de lavado, se eliminaron los contaminantes. Finalmente, se eluyó el ADN en agua libre de ARN, quedando preparada la muestra para su utilización.

3.3.2. Concentración del ADN purificado

Se concentró el ADN purificado mediante precipitación con una mezcla de etanol 100% a 2,5 volúmenes y acetato de sodio 3 M. Tras añadir la mezcla a la muestra de ADN y homogeneizar con agitador vórtex, se incubó durante 1 hora a -20 °C. Seguidamente, se centrifugó a 13000 r.p.m. a 4 °C, durante 10 minutos. Tras aspirar el sobrenadante, el pellet resultante se lavó con etanol 70%. Se volvió a centrifugar a 13000 r.p.m. a 4 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se dejó secar boca abajo sobre papel secante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 10 µl de agua libre de RNA.

3.3.3. Control de calidad de las muestras de ADN

Se comprobó la pureza de las muestras de ADN tras cada paso mediante espectrofotometría de UV visible (NanoDrop®, Thermo Scientific) según la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} , considerándose una pureza óptima de ADN a los valores entre 1,8 y 2,0.

Además, se midió la relación A_{260}/A_{230} para conocer la existencia de contaminantes, considerando su presencia cuando dicho ratio fue $<1,5$.

Finalmente, se calculó la concentración de ADN en la muestra según el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm⁽¹¹⁴⁾.

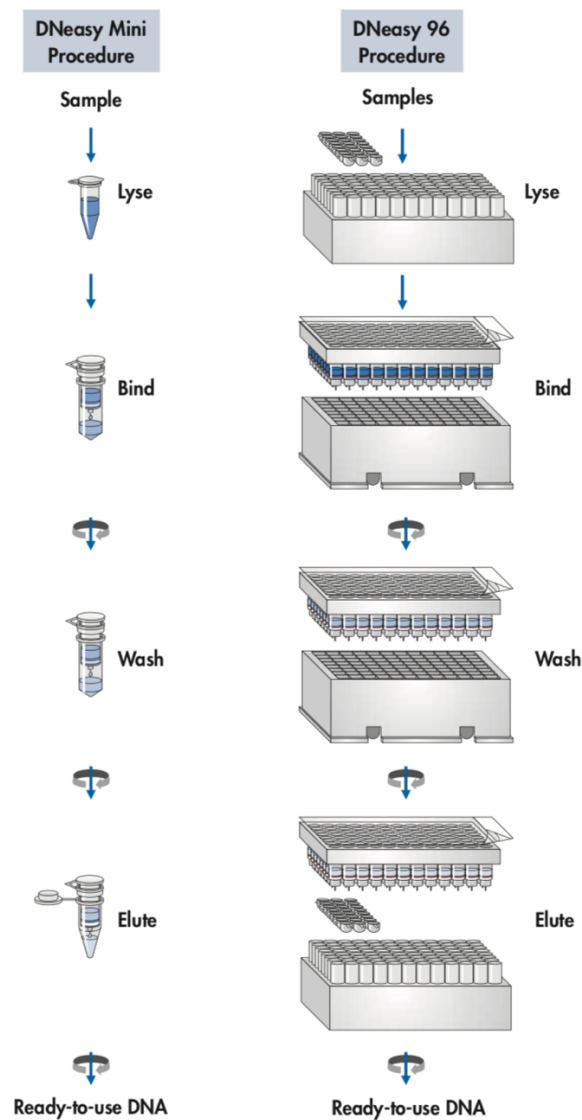


Figura 13. Esquema de purificación de ADN mediante mini columnas (QIAGEN N.V.)⁽¹¹³⁾.

3.3.4. Inmunosecuenciación de la región TCR- β

Se prepararon las muestras de ADN según las indicaciones de la “Guía de preparación de muestras de ratón” del servicio immunoSEQ® (Adaptive Biotechnologies) para la realización del ensayo de inmunosecuenciación de resolución profunda para sangre y células T⁽¹¹⁵⁾.

La inmunosecuenciación de la región TCR- β por Adaptive Biotechnologies Corp. (Seattle, WA, USA) se llevó a cabo en el ADN de 3 muestras pareadas de tumor y sangre periférica de ratones en los que no se aplicó ningún tratamiento y en 3 muestras pareadas de tumor y sangre de ratones en los que se realizó movilización con Neupogen®.

En resumen, el ADN se amplificó según una PCR múltiple en dos pasos en la cual la primera PCR amplificó la región CDR3 de los genomas de las células T y la segunda PCR añadió secuencias adaptadoras compatibles con Illumina®, desarrollador de inmunosecuenciación de nueva generación. La secuenciación fue realizada usando Illumina® y los datos fueron analizados utilizando el Analizador immunoSEQ® (Adaptive Biotechnologies)⁽¹¹⁶⁾.

Los resultados se expresaron como los 10 clones más frecuentes, es decir, el % del total de patrones de células T originadas por las 10 secuencias más frecuentes (figura 14)⁽¹¹⁷⁾. Se realizaron diagramas de dispersión log10 del número de clonotipos compartidos en las muestras pareadas de tumor y sangre periférica de cada ratón para comparar los dos grupos experimentales, con el objetivo de conocer si existió movilización de TILs a sangre periférica al aplicar el protocolo con Neupogen®.

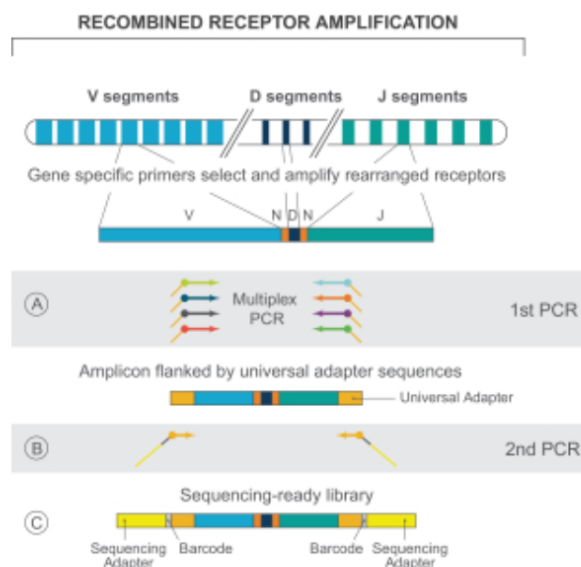


Figura 14. Esquema de la amplificación de la región CD3 del TCR a partir de ADN genómico por medio de PCR múltiple (Adaptive Biotechnologies).

3.4. INMUNOFENOTIPO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Se realizaron análisis mediante citometría de flujo de las muestras de sangre periférica, bazo y/o tumor de los ratones en los diferentes experimentos con el objetivo de determinar la composición de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y detectar la presencia de células PD1⁺.

3.4.1. Citometría de flujo en los experimentos con ratones inmunodeficientes

Se incubaron al menos 1×10^5 células de las muestras procesadas de sangre periférica y bazo con los anticuerpos monoclonales CD45.1, CD45.2, CD3, CD4, CD8, PD1, 7-AAD (Biolegend®) en un volumen de 100 μ l con PBS, durante 20 minutos a 4 °C y en oscuridad (tabla VII).

FITC	PE	PE/Cy7	PerCP-Cy5.5	APC	APC/Cy7	PB
CD45.2	CD45.1	CD3	7-AAD	CD8	PD1	CD4

Tabla VII. Panel de citometría de flujo utilizado en los experimentos con ratones inmunodeficientes.

3.4.2. Citometría de flujo en los experimentos con ratones inmunocompetentes

Se incubaron al menos 1×10^5 células de las muestras procesadas de sangre periférica y tejido tumoral con los anticuerpos monoclonales CD45.2, CD3, CD4, CD8, PD1 y 7-AAD en un volumen de 100 μ l con PBS, durante 20 minutos a 4 °C y en oscuridad (tabla VIII). El anticuerpo monoclonal CD4 se utilizó en PE o PB según el experimento.

FITC	PE	PE/Cy7	PerCP-Cy5.5	APC	APC/Cy7	PB
CD45.2	CD3	CD4	7-AAD	CD8	PD1	CD4

Tabla VIII. Panel de citometría de flujo utilizado en los experimentos con ratones inmunocompetentes.

3.5. CULTIVOS *IN VITRO* DE LINFOCITOS T MURINOS

3.5.1. Cultivo de esplenocitos de ratones 129/SvJ

Para la obtención de esplenocitos, se sacrificaron ratones 129/SvJ mediante inhalación con CO₂ y se extrajo el bazo por medio de una laparotomía transversa izquierda. Las muestras tisulares se transportaron en tubos cónicos con 10 ml de PBS.

Se realizó una disgregación mecánica sobre un filtro de 40 µm en tubos cónicos con 30 ml de PBS para la suspensión celular. Se utilizó Türk a una dilución de 1/10 para el conteo de leucocitos con cámara de Neubauer. Posteriormente, se separaron alícuotas con 1×10^6 células blancas que se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, los pellets resultantes se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS 10%, penicilina-estreptomicina 0,5% (Gibco™) y diferentes concentraciones de IL-2 humana (Proleukin®, Novartis) o murina recombinante (Stemcell™). Como control de la expansión se utilizó fitohemaglutinina (PHA) 5 µg/ml (Sigma-Aldrich), un conocido estimulador inespecífico de la proliferación de células T.

Se sembraron las células en placas p24 (Falcon®, Becton Dickinson) que se mantuvieron en cultivo a 37 °C y 5% CO₂. Se observaron diariamente para comprobar la aparición de “rosetas” (forma típica de proliferación del cultivo de linfocitos en humanos)⁽¹¹⁸⁾. Cada 4 días se refrescó el medio suplementado.

Se analizó la supervivencia de la población de linfocitos T por citometría de flujo mediante el anticuerpo monoclonal 7-AAD y la expansión según los marcadores de superficie CD45 y CD3 (Biolegend®) a los 3, 6 y 14 días o a los 5, 7 y 12 días, según las condiciones empleadas.

3.6. CO-CULTIVOS *IN VITRO* DE NEUROESFERAS NB36769 Y TILs

3.6.1. Obtención de TILs de sangre periférica

Tras exanguinación de los ratones se mantuvieron las muestras sanguíneas en tubos eppendorf con 50 µl de EDTA 0,5 M, a temperatura ambiente.

La lisis del componente eritrocitario se llevó a cabo tal como se describe en el apartado 3.1.6. Tras ello, se filtró la suspensión celular resultante a través de un filtro de 0,2 µm (Acrodisc®, Sigma-Aldrich) y el conteo de linfocitos se realizó en cámara de Neubauer con Türk a una dilución 1/10.

Posteriormente, se procedió a la purificación de la suspensión celular con la fracción linfocitaria para suprimir el componente *naïve* (expresan CD62L). Para ello, se realizó una separación inmunomagnética negativa o depleción mediante microesferas MACS® (*Magnetic-activated cell sorting*) selectivas para CD62L de ratón (Miltenyi Biotec). Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos específicos anti-CD62L unidos a la superficie de unas esferas superparamagnéticas formadas por óxido de hierro y dextranos que marcan las células que expresan dicho antígeno, como son las células T *naïve*. La separación se lleva a cabo haciendo pasar la muestra a través de una columna que contiene una matriz compuesta de esferas ferromagnéticas. Cuando se coloca la columna sobre un imán, se crea un campo magnético de gran intensidad que retiene en la columna las microesferas y, por tanto, las células unidas a ellas a través de los complejos antígeno-anticuerpo, mientras que las células no marcadas fluyen a través de la misma. Esta fracción celular eluida queda deplecionada de células CD62L⁺ (figura 15)⁽¹¹⁹⁾.

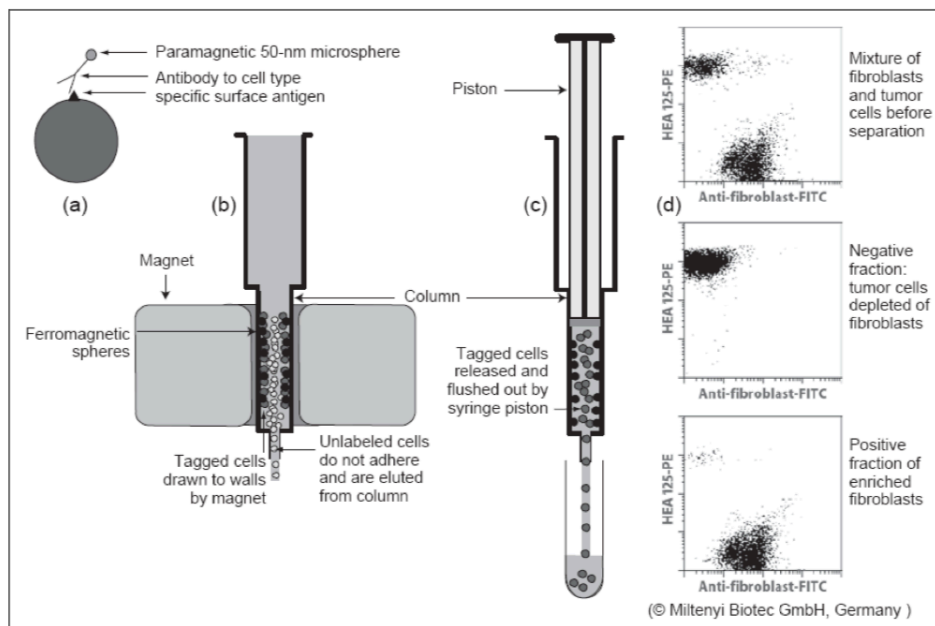


Figura 15. Esquema de una selección negativa o depleción de células mediante microesferas MACS® (Miltenyi Biotec)⁽¹¹⁹⁾.

Se usaron las microesferas para ratón CD62L (L-selectina) (Miltenyi Biotec) y una solución tampón compuesta por PBS pH 7,2 con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM.

La suspensión celular obtenida previamente se centrifugó a 300xg durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el pellet resultante se resuspendió en la solución tampón, siguiendo las recomendaciones del fabricante, a una dilución de 90 μ l por cada 10^7 células. Seguidamente, se añadieron 10 μ l de microesferas CD62L (L-selectina) por cada 10^7 células. La

mezcla se incubó durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se lavaron las células con 1 ml de solución tampón por cada 10^7 células y se centrifugaron a 300xg durante 10 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 500 µl de solución tampón por cada 10^8 células, quedando preparada la suspensión celular para su separación.

Para ello, utilizamos el MACS® Separator con columnas LS (Miltenyi Biotec). Se lavaron previamente las columnas con 3 ml de solución tampón, antes de aplicar la suspensión celular. Tras ello, se recogió la fracción eluida y se realizaron hasta tres lavados con 3 ml de cada columna. Finalmente, se retiraron las columnas del campo magnético y se recolectó la fracción deplecionada por separado mediante la ayuda de un émbolo.

3.6.2. Marcaje de los linfocitos con CFSE

La fracción celular deplecionada (CD62L-) se contó nuevamente con Türk. Estas células se marcaron con el kit de proliferación celular CFSE (CellTrace™, Thermo Fisher Scientific) en PBS a 37 °C con una concentración de CFSE 2 µM por cada 10^6 células, según las indicaciones del fabricante. La suspensión celular obtenida tras las incubaciones se lavó y resuspendió en medio RPMI-1640 para su cultivo.

3.6.3. Ensayo funcional de proliferación de los TILs frente a neuroesferas

Las suspensiones celulares obtenidas de ambos grupos (no movilizados vs movilizados) se cultivaron con neuroesferas NB36769 en placas p96 de fondo U (Falcon®, Becton Dickinson) con 200 µl de medio RPMI-1640 suplementado con FBS 10%, penicilina-estreptomicina 0,5% e IL-2 humana a 50 UI/ml a dos ratios diferentes de 1:1 y de 1:10 (neuroesferas:linfocitos) por duplicado.

3.6.4. Citometría de flujo

Se realizó un conteo celular con Türk a una dilución 1:2 y análisis por citometría de flujo a las 24, 48 y 72 horas.

Se incubaron las células de los co-cultivos con los anticuerpos monoclonales CD3 y 7-AAD (Biolegend®) en un volumen de 100 µl con PBS, durante 20 minutos a 4 °C y en oscuridad. Se analizó la dilución de CFSE para estimar la proliferación de la población linfocitaria frente al estímulo de las neuroesferas.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se recogieron en hojas de cálculo EXCEL (Microsoft, Office 2010) y se realizaron los análisis estadísticos utilizando el programa *SPSS software package* (SPSS Inc.).

La presentación de los valores cuantitativos se muestra con los métodos estadísticos descriptivos de la media y desviación estándar. La distribución de variables categóricas se describió por medio de frecuencias absolutas y relativas. La representación gráfica de estas variables se hizo mediante el uso de gráficos de barras.

Para comparar los resultados cuantitativos entre grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis debido al limitado número de casos experimentales. Las comparaciones entre variables cualitativas se realizaron con test exacto de Fisher, según el mismo criterio. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si el *p valor* era menor de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. INYECCIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILs) EN RATÓN INMUNODEFICIENTE PARA EL ANÁLISIS DE LA CIRCULACIÓN LINFOCITARIA POR EL ORGANISMO

En un estudio piloto, se utilizaron tres ratones macho *NOD scid gamma*, carentes de linfocitos T autólogos. En dos de ellos se inyectó una suspensión celular de células NB36769 en el tejido celular subcutáneo tal como se describe en Material y Métodos. De forma simultánea, se obtuvieron muestras tumorales de ratones inmunocompetentes generadas mediante el modelo de trasplante ortotópico⁽¹⁰⁹⁾. A partir de estas muestras, se aislaron los linfocitos presentes en el tumor mediante el procedimiento descrito en el apartado de Material y Métodos para el procesamiento de las muestras tumorales. Las células obtenidas se mantuvieron en condiciones de cultivo *in vitro* con medio RPMI-1640 suplementado con FBS 10% y penicilina-estreptomicina 0,5%. Al octavo día postinyección, se recogieron las suspensiones celulares que contenían los TILs cultivados y se inocularon en los tres ratones. Al sexto día postinóculo, en uno de los ratones se inició un protocolo de movilización con bajas dosis de Neupogen®. Se exanguinaron los ratones y se sacrificaron al 19º día de experimento, obteniéndose muestras de sangre periférica y bazo, pero no se observó tejido tumoral en la localización subcutánea donde se había inyectado la suspensión celular (figura 16).

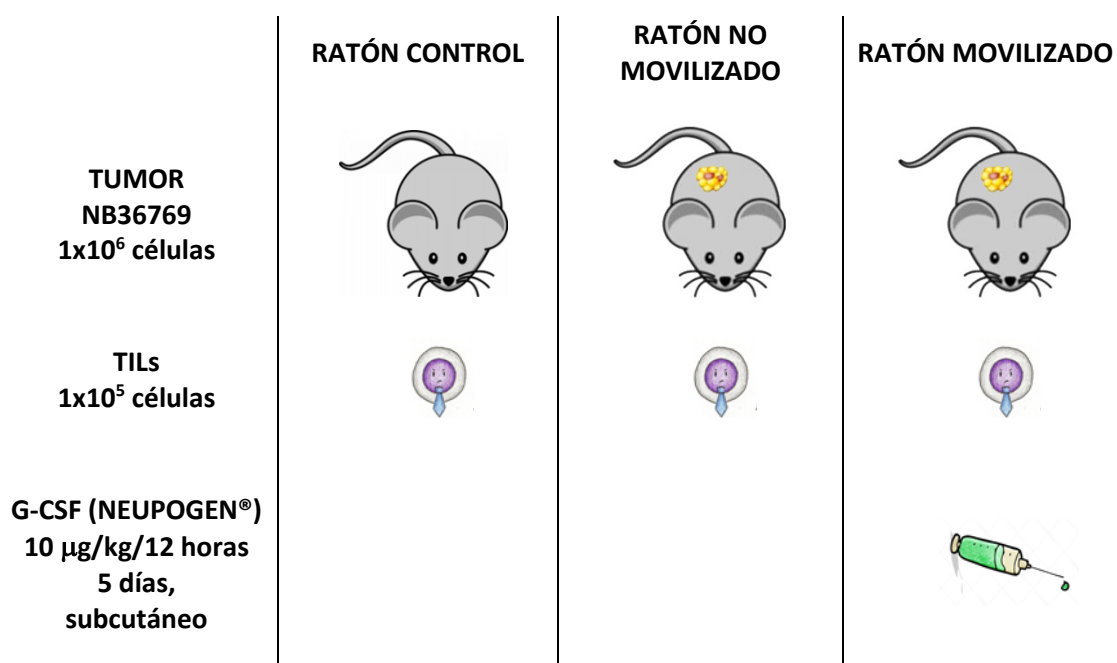


Figura 16. Esquema indicativo del experimento con ratones *NOD scid gamma* inmunodeficientes.

4.1.1. LA SUBPOBLACIÓN PRINCIPAL DE LINFOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA TRAS LA INYECCIÓN DE TILs EN EL RATÓN INMUNODEFICIENTE CORRESPONDE A LINFOCITOS T CD4

Mediante el estudio de citometría de flujo según el panel descrito en el apartado de Material y Métodos, se comprobó que el mayor número total de linfocitos T en sangre periférica lo presentaba el ratón control, mientras que en el ratón que recibió Neupogen® la cifra de los mismos era superior a la del ratón en el que no se aplicó dicho protocolo (2,7%, 1% y 3,2%, respectivamente) (figura 17). El análisis de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de cada ratón, demostró que el componente principal de linfocitos T estaba formado por linfocitos CD4 (83,1%, 86,1% y 19,9%, respectivamente) siendo a su vez positivos para PD1 el 0,4 y el 0,3% para el ratón control y para el ratón no movilizado, respectivamente. Sin embargo, en el caso del ratón que recibió el protocolo de movilización el porcentaje de linfocitos T positivos para PD1 aumentó al 0,6%.

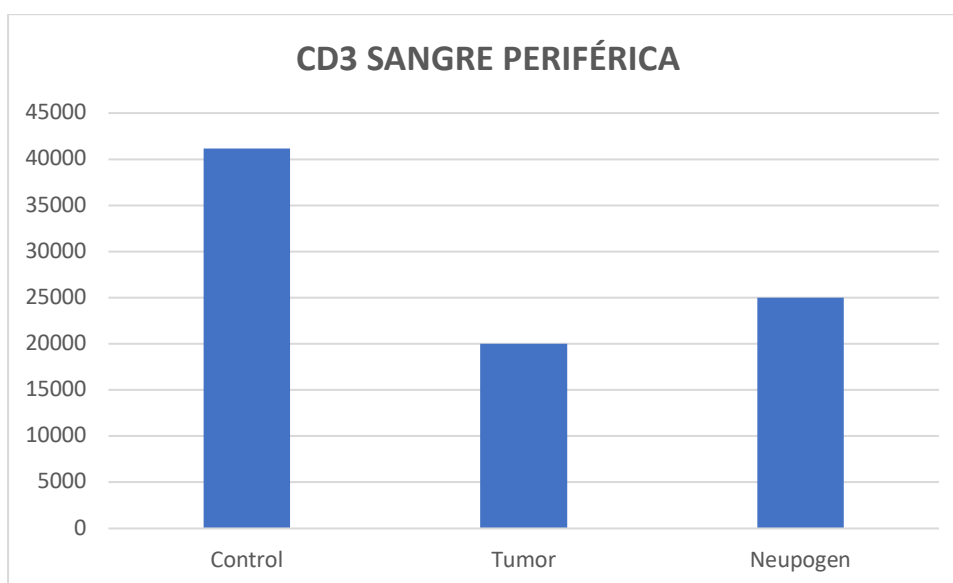


Figura 17. Componente linfocitario en la sangre periférica de los ratones inmunodeficientes *NOD scid gamma* tras la inyección de TILs (número total de células/ml).

Por el contrario, no se identificaron linfocitos CD8 positivos en el ratón movilizado ni en el ratón control, mientras que en el ratón con tumor no movilizado el porcentaje de los mismos fue mínimo (0,1%), sin que se recuperaran linfocitos CD8 positivos también para PD1 (figura 18).

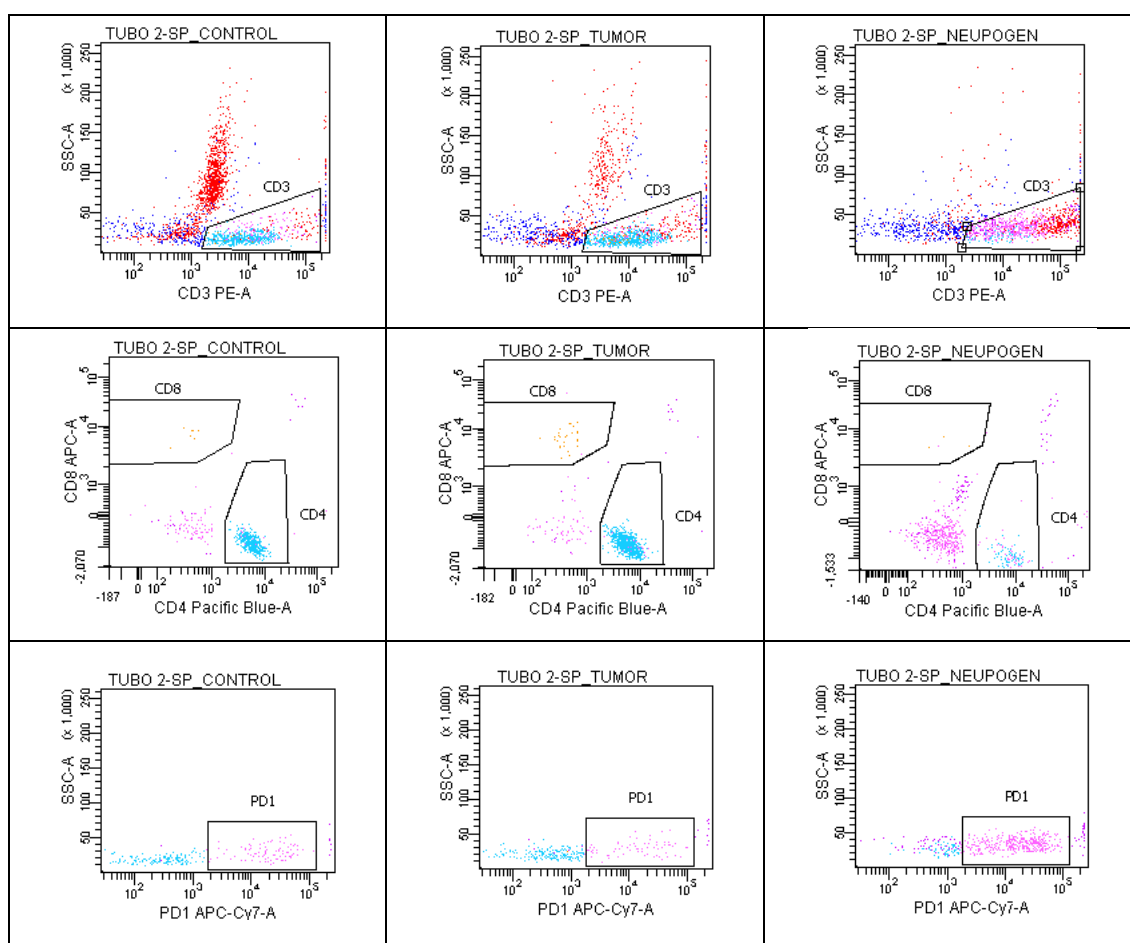


Figura 18. Subpoblaciones linfocitarias T por citometría de flujo en la sangre periférica de los ratones *NOD scid gamma* tras la inyección de TILs.

4.1.2. LA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS QUE EXPRESAN EL MARCADOR PD1 ES MAYOR EN EL BAZO QUE EN SANGRE PERIFÉRICA TRAS LA INYECCIÓN DE TILs EN EL RATÓN INMUNODEFICIENTE

Al analizar el infiltrado linfocitario del bazo, observamos que el porcentaje de linfocitos T es similar en el ratón control y en el no movilizado (20,9% y 20,4%), mientras que es ligeramente inferior en el ratón movilizado (16%) (figura 19).

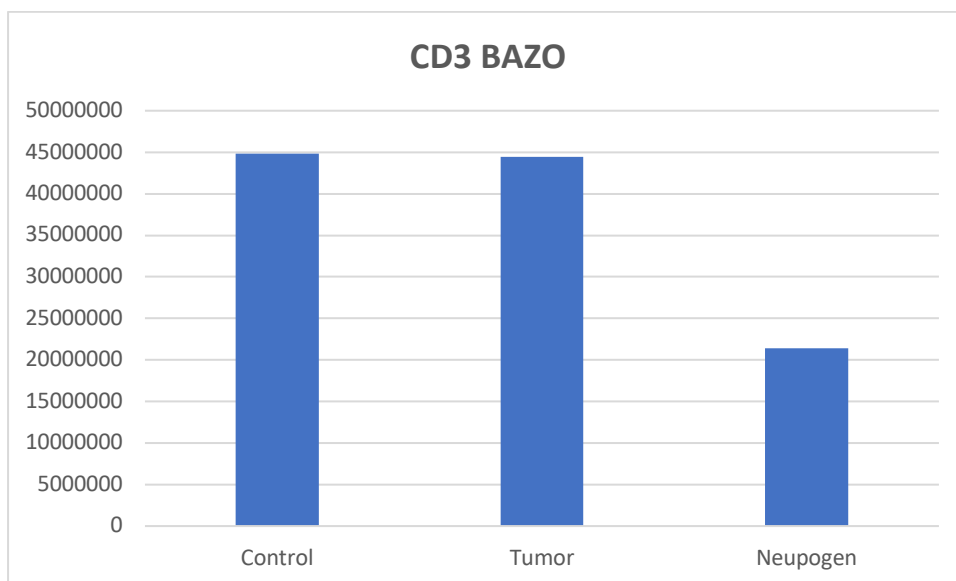


Figura 19. Componente linfocitario T en el bazo de los ratones inmunodeficientes tras la inyección de TILs (número total de células/ml).

Cuando analizamos las subpoblaciones linfocitarias en el bazo, encontramos que existe un mayor porcentaje de linfocitos T PD1 positivos que en sangre periférica en los tres animales. Los linfocitos T PD1⁺ incluyen células circulantes pertenecientes a la población de TILs que se localizan en el microambiente tumoral^(63,64,120). Este porcentaje es mayor en el ratón control (6,5%) y disminuye en los ratones portadores de tumor siendo más bajo en el ratón movilizado (4,3%) frente al no movilizado (6,2%). En los tres casos, la subpoblación de linfocitos T positivos para PD1 está compuesta por linfocitos CD4, sin que se identifiquen linfocitos PD1 positivos también para CD8 (figura 20).

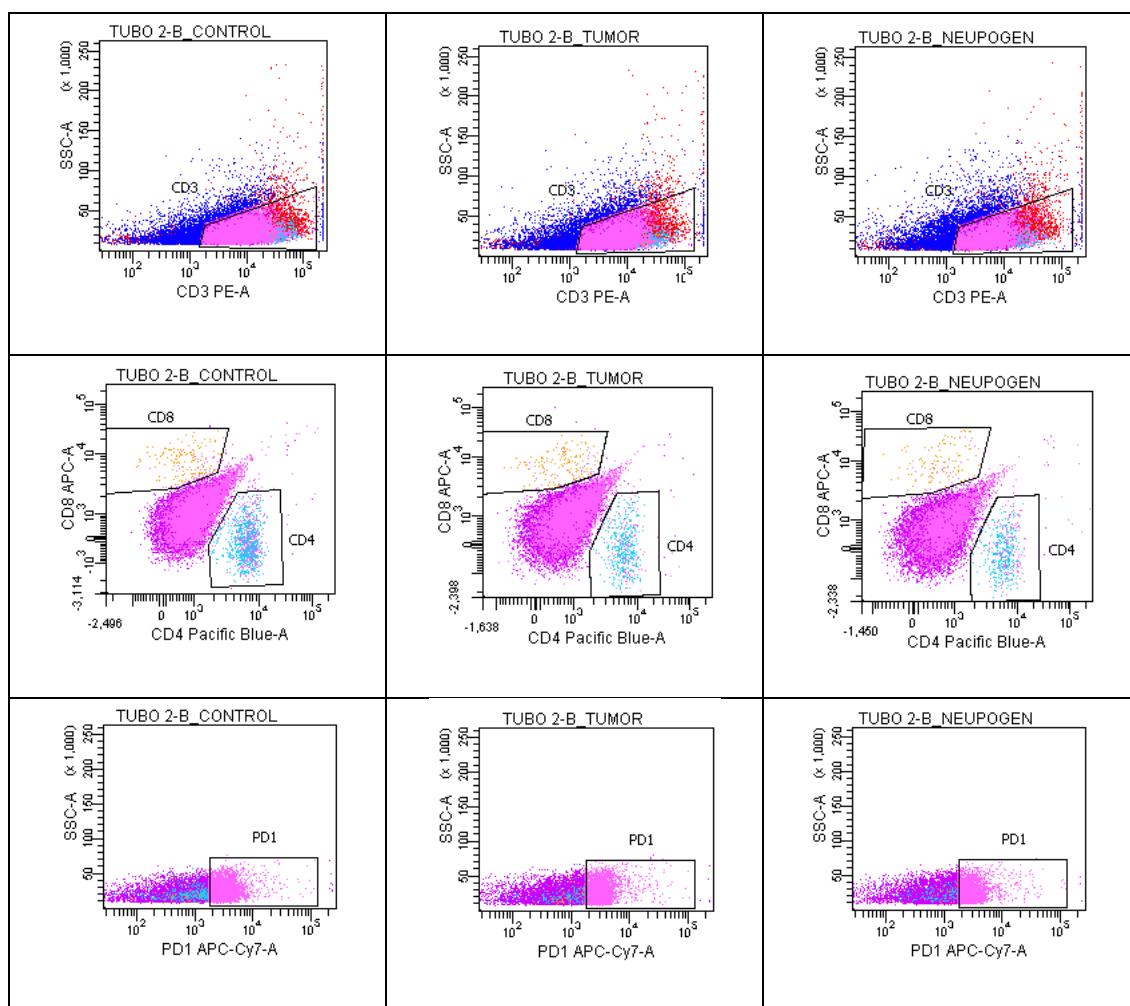


Figura 20. Subpoblaciones linfocitarias T por citometría de flujo en el bazo de los ratones *NOD scid gamma* tras la inyección de TILs.

4.2. MOVILIZACIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILs) EN EL RATÓN INMUNOCOMPETENTE

Una vez comprobada la existencia de circulación de linfocitos T sugerentes de pertenecer a la subpoblación TILs por el organismo del ratón inmunodeficiente, nuestro siguiente objetivo consistió en confirmar dicha circulación en el animal inmunocompetente y comprobar si es posible aumentar la proporción de TILs en sangre mediante protocolos de movilización basados en la utilización de G-CSF.

Para ello, basándonos en el modelo de trasplante ortotópico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes descrito en el apartado de Material y Métodos, dividimos a 8

ratones hembra 129/SvJ WT trasplantadas en dos grupos de 4 animales: un grupo A (no movilizado), en el que no se realizó ninguna intervención además del trasplante; y el grupo B (movilizado) en el que se aplicó el protocolo de movilización a bajas dosis a las 3 semanas postrasplante (figura 21). En la 4ª semana postrasplante, se exanguinaron los ratones y se extirparon los tumores para su estudio por citometría de flujo.

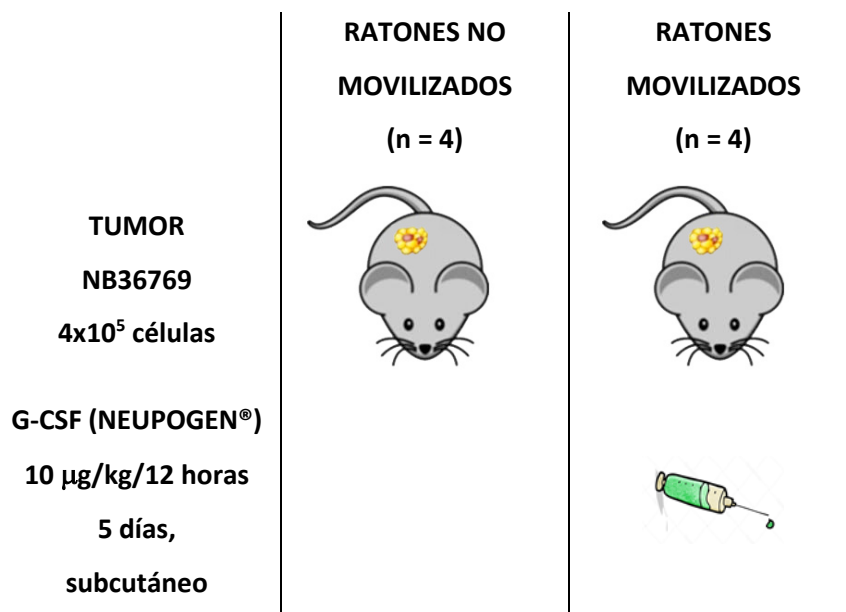


Figura 21. Esquema indicativo del desarrollo del experimento en ratones inmunocompetentes mediante trasplante ortotópico de neuroblastoma para movilización de TILs.

4.2.1. LA MOVILIZACIÓN CON G-CSF DE LINFOCITOS T A SANGRE PERIFÉRICA EN EL RATÓN INMUNOCOMPETENTE ES DOSIS DEPENDIENTE

Cuando analizamos los niveles de linfocitos T en sangre periférica mediante el marcador de superficie CD3, observamos que la utilización de un protocolo de movilización con G-CSF a dosis de 10 µg/kg/dosis, cada 12 horas durante 5 días, no aumenta el valor de los mismos. Obtuvimos una media de 1238531,25 linfocitos T en sangre periférica (30,9%) en los ratones no movilizados, frente a una media de 837412,5 células (27,8%) en los ratones que fueron movilizados ($p = 0,31$) (figura 22).

CD3 EN SANGRE PERIFÉRICA

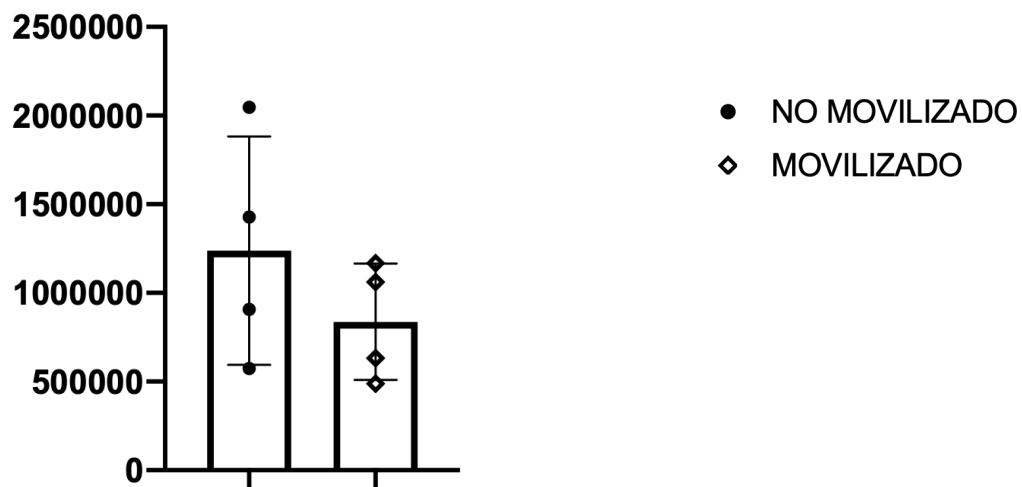


Figura 22. Niveles de linfocitos T en sangre periférica tras movilización con G-CSF a 10 $\mu\text{g/kg/dosis}$ cada 12 horas, durante 5 días.

En relación a los niveles de linfocitos T en el tumor, observamos un aumento de la infiltración por estas células en las muestras obtenidas de los animales movilizados, de tal manera que la media en los animales movilizados fue de 1236375 linfocitos T (0,7%), mientras que en los ratones no movilizados fue de 210187,5 (0,15%), siendo esta diferencia no significativa ($p = 0,15$) (figura 23).

CÉLULAS CD3 INTRATUMORALES

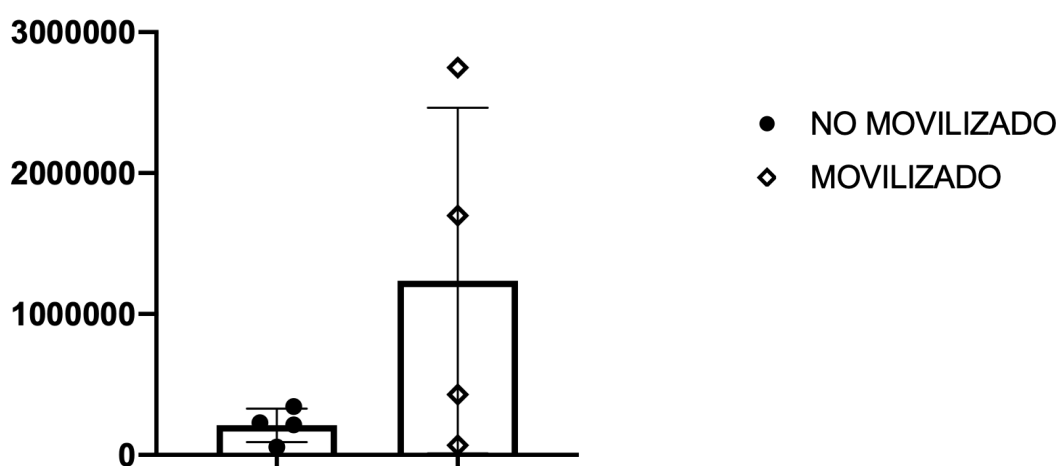


Figura 23. Niveles de linfocitos T intratumorales tras movilización con G-CSF a 10 $\mu\text{g/kg/dosis}$ cada 12 horas, durante 5 días.

Ante la obtención de los resultados expuestos, nos planteamos la necesidad de incrementar las dosis de G-CSF para conseguir la movilización del reservorio de linfocitos T en el animal inmunocompetente. Decidimos utilizar el protocolo de movilización a altas dosis de Neupogen® (250 µg/kg/dosis cada 12 horas, inyección subcutánea, durante 5 días) en un experimento similar con 4 ratones.

Al comparar los niveles de linfocitos T en sangre periférica entre los tres grupos (A, no movilizado o control; B, movilizado con dosis bajas de G-CSF; C, movilizado con dosis altas de G-CSF), obtuvimos que el grupo en el que se aplicó un protocolo de movilización a altas dosis, presentó un mayor valor absoluto promedio de linfocitos T ($2093500 \pm 617939,53$ células; 22,7%), respecto al grupo movilizado con bajas dosis ($837412,5 \pm 328291$ células; 27,8%) y al grupo control ($1238531,25 \pm 643732,51$ células; 30,95%) ($p = 0,059$) (figura 24).

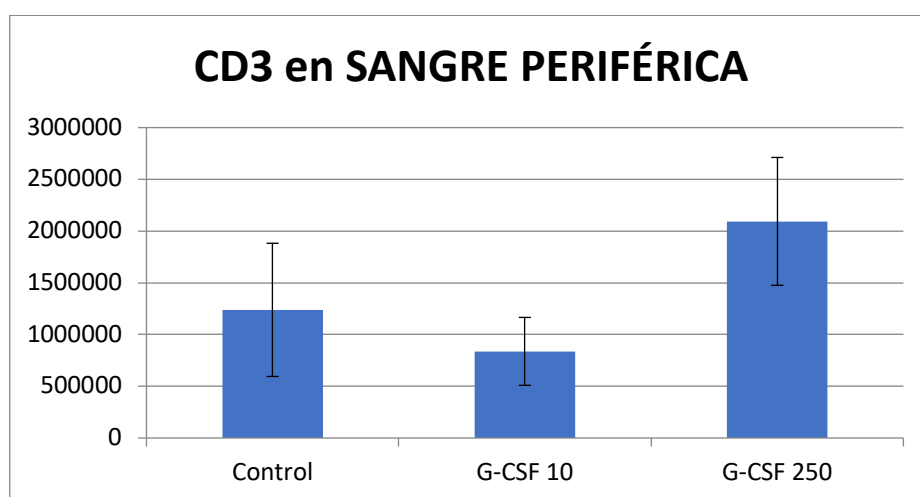


Figura 24. Niveles de linfocitos T en sangre periférica tras movilización con G-CSF. Grupo A (control), control; B (G-CSF 10), movilizado con dosis bajas de G-CSF (10 µg/kg/dosis); C (G-CSF 250), movilizado con dosis altas de G-CSF (250 µg/kg/dosis).

Por otra parte, al estudiar los niveles de linfocitos T en la masa tumoral, obtuvimos que el protocolo de movilización con altas dosis de G-CSF generaba un mayor infiltrado linfocitario T en el tumor ($2106312,5 \pm 1326234,1$ células) respecto a los otros dos grupos (bajas dosis: $1236375 \pm 1226331,8$ células; control: $210187,5 \pm 118031,31$), pero esta diferencia no era estadísticamente significativa ($p = 0,059$) (figura 25).

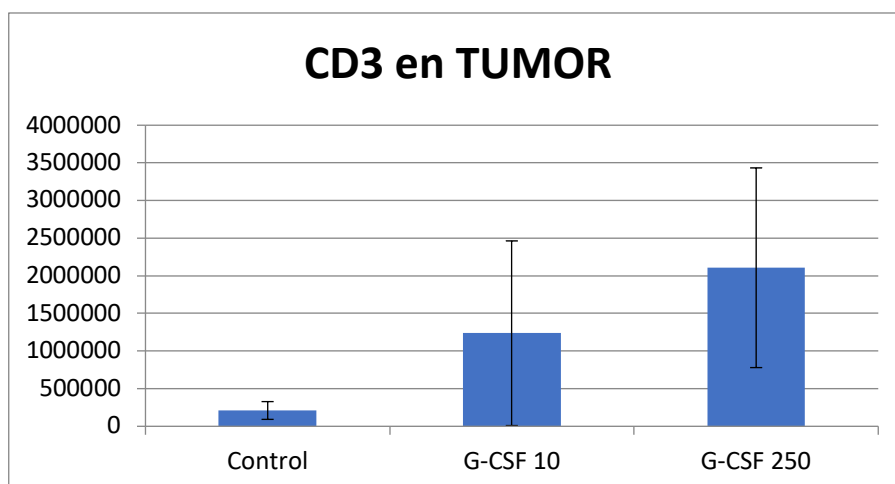


Figura 25. Niveles de linfocitos T intratumorales tras movilización con G-CSF. Grupo A (control), control; B (G-CSF 10), movilizado con dosis bajas de G-CSF (10 $\mu\text{g/kg/dosis}$); C (G-CSF 250), movilizado con dosis altas de G-CSF (250 $\mu\text{g/kg/dosis}$).

Analizando las características del componente linfocitario en la sangre periférica en el grupo movilizado con altas dosis de G-CSF, vemos que de la proporción de linfocitos CD3 positivos (24%) la mayoría se tratan de CD4 (77,4%), siendo también positivos para PD1 (59%). Por otra parte, se recuperan también linfocitos CD8 positivos (4,5%) para PD1, aunque éstos representan una subpoblación muy pequeña en el repertorio total (0,9%) (figura 26).

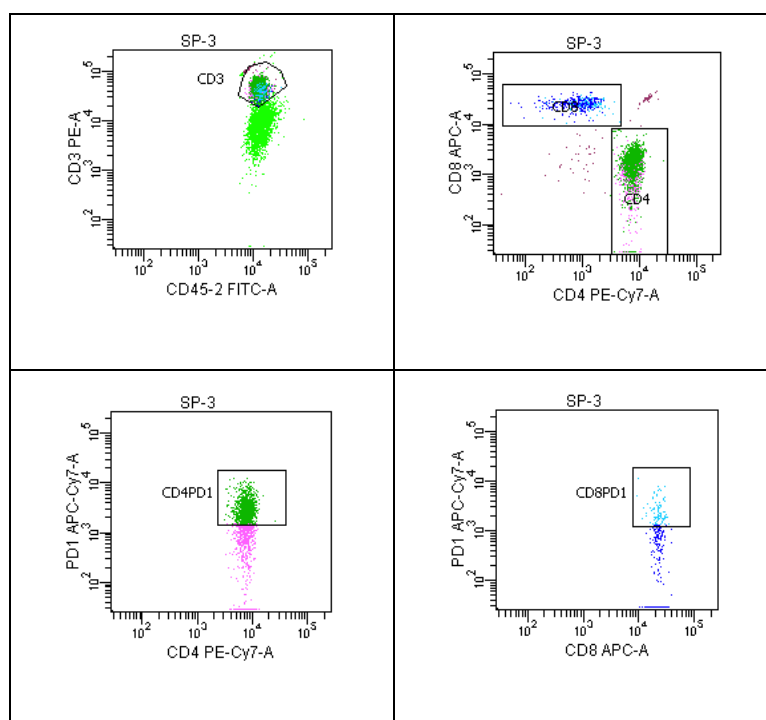


Figura 26. Características por citometría de flujo del componente linfocitario en la sangre periférica tras movilización con G-CSF a altas dosis.

Sin embargo, cuando observamos el infiltrado linfocitario de las muestras tumorales, el componente CD3 positivo supone tan sólo un 0,75%, siendo mayoritariamente CD4 positivo también para PD1 (58,45%). Por el contrario, la fracción de linfocitos CD8 tan sólo supone un 0,1% del total de leucocitos (7,4% de la fracción de CD3) en las muestras en que se identifica y se recuperaron linfocitos CD8 positivos también para PD1 en una única muestra tumoral (figura 27).

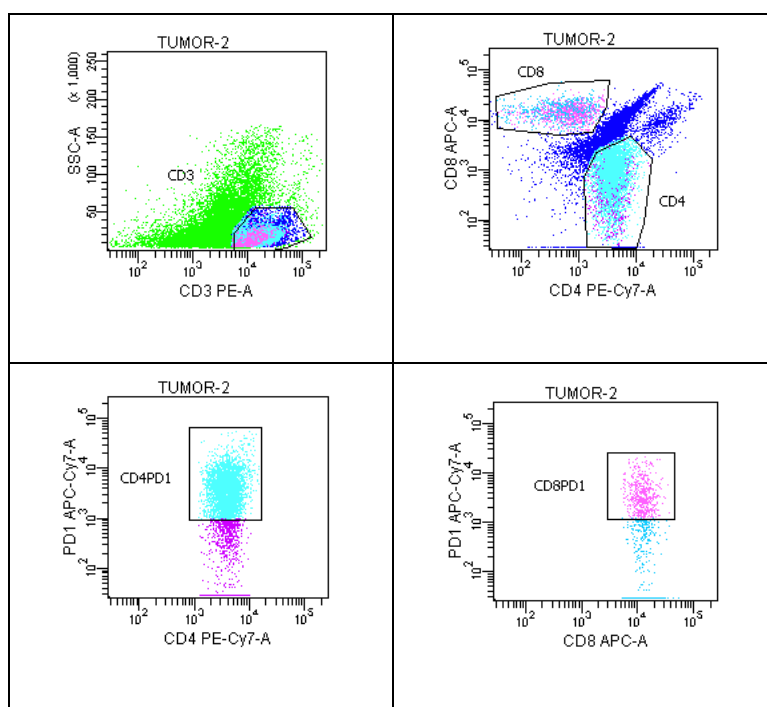


Figura 27. Características por citometría de flujo del infiltrado linfocitario T intratumoral tras movilización con G-CSF a altas dosis.

4.3. IDENTIFICACIÓN DEL REPERTORIO DE CÉLULAS T INFILTRANTES DE TUMOR EN EL NEUROBLASTOMA Y SU MOVILIZACIÓN A SANGRE PERIFÉRICA

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del repertorio de los linfocitos infiltrantes de tumor contra el neuroblastoma y confirmar su movilización a la sangre periférica realizamos un análisis mediante secuenciación masiva de la región variable de la subunidad β del TCR.

En este estudio, se evaluó el repertorio del TCR de TILs y linfocitos circulantes provenientes de 6 neuroblastomas generados a partir de trasplante ortotópico de neuroesferas

NB36769 en ratones hembra 129/SvJ WT TH-MYCN y de la sangre periférica correspondiente a cada animal. En tres de ellos, se realizó a las 3 semanas postinjerto la movilización de linfocitos mediante el protocolo a altas dosis. Las muestras fueron recogidas y procesadas de forma similar para todos los animales a las 4 semanas postinjerto. La extracción del ADN se realizó de suspensiones celulares congeladas sin purificación previa de los linfocitos de muestras de sangre periférica y tumor para cada animal utilizando el kit QIAamp DNA (Qiagen) como se describe en Material y Métodos. Se realizó una secuenciación masiva del TCR- β (Adaptive Biotechnologies) en todas las muestras (figura 28).

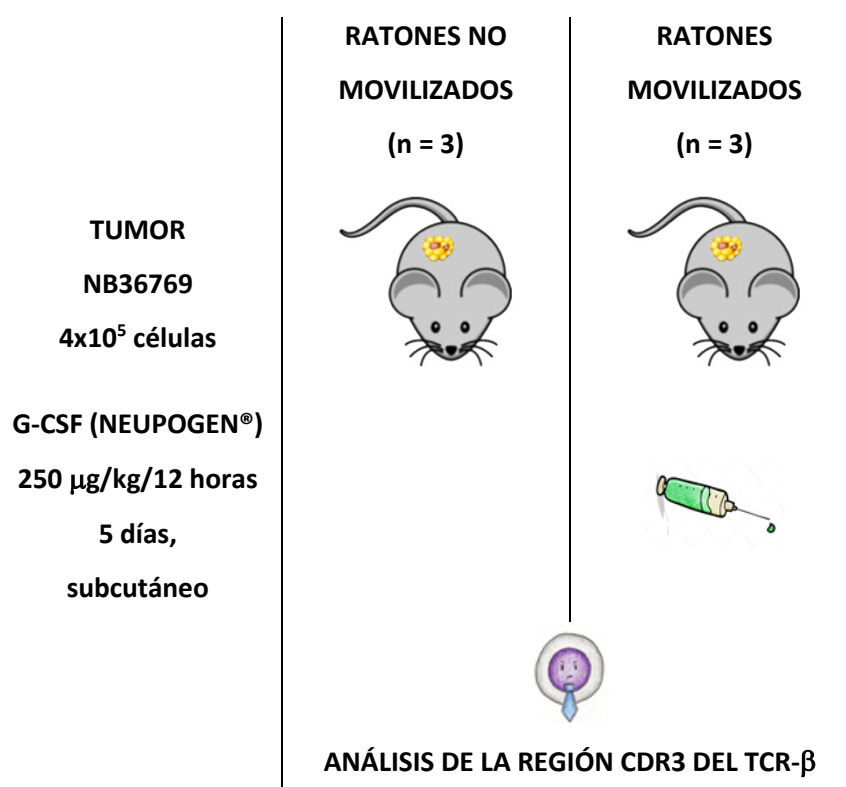


Figura 28. Esquema indicativo del desarrollo del experimento en ratones inmunocompetentes mediante trasplante ortotópico de neuroblastoma para análisis de la región CDR3 del TCR- β .

4.3.1. EXISTENCIA DE UNA DISTRIBUCIÓN CLONAL ESPECÍFICA DE LOS LINFOCITOS T EN LAS MUESTRAS TUMORALES

Inicialmente, analizamos los 10 clones más frecuentes (% total de patrones celulares T originados de las 10 secuencias más frecuentes) en las muestras tumorales y de sangre periférica de los ratones no movilizados. Observamos que los 10 clones más frecuentes constituían el $11,09\% \pm 2,83\%$ del repertorio del TCR mientras que en la sangre periférica dicha proporción tan sólo representaba el $1,59\% \pm 0,59\%$ ($p = 0,024$). Estos resultados sugieren un

enriquecimiento de clonotipos (secuencias de aminoácidos) específicos dentro del tejido tumoral (figuras 29 y 30).

Destaca en el análisis de las muestras tumorales que los 10 clones más frecuentes corresponden a una menor proporción del repertorio del TCR en los ratones en los que se aplicó el protocolo de movilización con G-CSF correspondientes a las muestras T10, T11 y T12 ($2,27\% \pm 1,03\%$) frente a los ratones que no fueron movilizados ($11,09\% \pm 2,83\%$) ($p = 0,325$) (figura 29). Sin embargo, no se observa una correspondencia de dicho hallazgo en las muestras pareadas de sangre periférica (figura 30), lo que podría sugerir un aumento del infiltrado linfocitario inespecífico intratumoral secundario a la administración de Neupogen®.

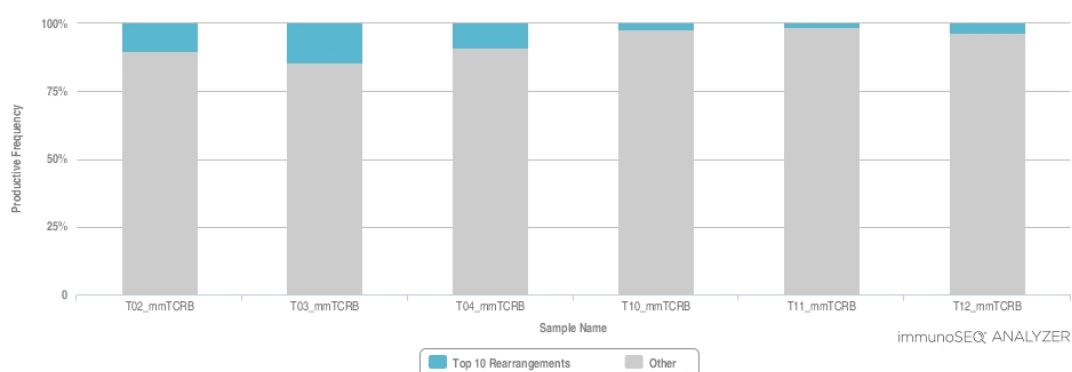


Figura 29. Distribución de la clonalidad de los linfocitos T mediante secuenciación profunda de la subunidad β del TCR en las muestras tumorales. Grupo no movilizado correspondiente a las muestras T02 - T04; grupo movilizado correspondiente a las muestras T10 – T12. En azul se muestran los 10 clones más frecuentes; en gris el resto de clones.

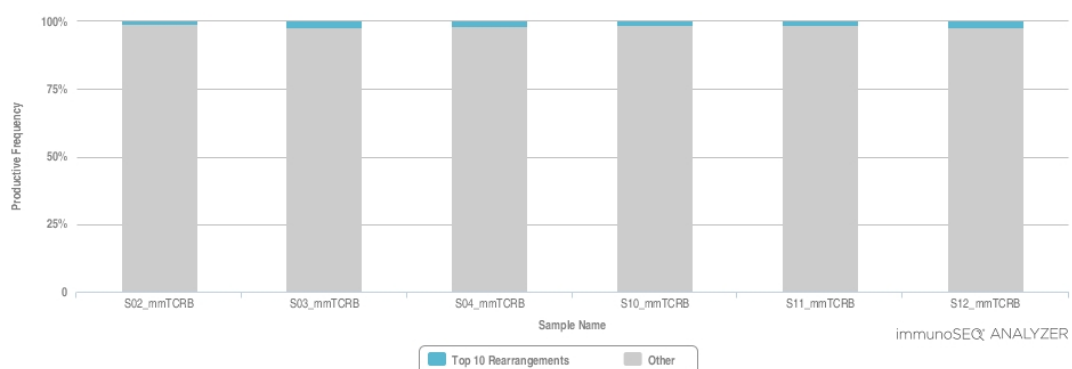


Figura 30. Distribución de la clonalidad de los linfocitos T mediante secuenciación profunda de la subunidad β del TCR en la sangre periférica. Grupo no movilizado correspondiente a las muestras S02 - S04; grupo movilizado correspondiente a las muestras S10 – S12. En azul se muestran los 10 clones más frecuentes; en gris el resto de clones.

4.3.2. EXISTENCIA DE SECUENCIAS TCR- β COMPARTIDAS ENTRE DIFERENTES MUESTRAS TUMORALES EN EL NEUROBLASTOMA

Cuando investigamos la distribución clonal de las células T en las muestras tumorales, encontramos que no existen secuencias comunes para todos los tumores analizados. Sin embargo, existen dos secuencias compartidas por tres de las muestras tumorales y cinco por dos, representando el 7,64% del repertorio de TCR en todas las muestras (figura 31). La existencia de secuencias clonoespecíficas similares en los linfocitos T de diferentes animales que comparten los antígenos del MHC sugiere que dichas subpoblaciones de linfocitos T se han expandido frente a un antígeno que comparten los diferentes individuos y es presentado por las moléculas del MHC. La importancia de dichas secuencias reside en que podrían corresponder con clones específicos de tumor contra el neuroblastoma (Tabla IX).

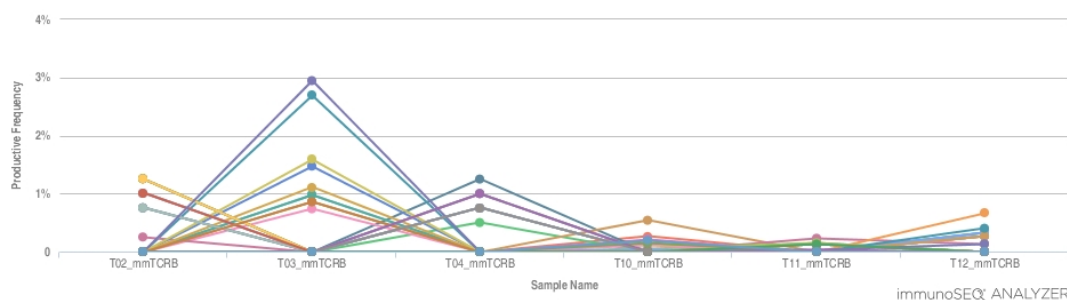


Figura 31. Análisis de las secuencias de TCR compartidas entre todas las muestras tumorales.

Amino Acid	Sum (Productive Frequency)	Present In
CASSQDRGSYEYF	0,614106	3
CASSPGQGAGEYF	3	3
CASSQNQAPLF	0,195684	2
CASSQGQSSYEYF	0,834896	2
CASSQDWGDEYF	0,356441	2
CASSPRTGDYAEQFF	1	2
CASGDLGGSATLYF	2	2

Tabla IX. Secuencias compartidas por dos o más de las muestras tumorales que podrían constituir clonotipos específicos de TILs contra el neuroblastoma.

4.3.3. LA MOVILIZACIÓN CON G-CSF AUMENTA EL NÚMERO DE CLONOTIPOS COMPARTIDOS EN LA SANGRE PERIFÉRICA

Para conocer si existe movilización de TILs a sangre periférica con G-CSF realizamos diagramas de dispersión log10 en las muestras pareadas de tumor y sangre periférica de cada ratón. Se observó un mayor número de clonotipos compartidos en los ratones que habían recibido Neupogen® frente a los que no lo recibieron. Por ejemplo, en el animal 10 observamos que existen 1244 secuencias compartidas entre la sangre periférica y el tumor, mientras que cuando analizamos los clones más frecuentes en ambas muestras, 4 de ellos son compartidos y suponen el 1,16% del repertorio del TCR, lo que podría estar en relación con la habilidad de expansión de los clones específicos de tumor y su movilización a sangre periférica (figura 32a).

Por el contrario, cuando analizamos el ratón 2 en el que no se aplicó Neupogen®, encontramos que comparten tan sólo 105 secuencias, de las cuales ninguna forma parte de los 10 clones más frecuentes (figura 32b).

Dichos resultados son similares para el resto de muestras pareadas como se muestra en los gráficos de secuencias compartidas (figuras 33 a 36, correspondientes a los animales 03, 04, 11 y 12, respectivamente).

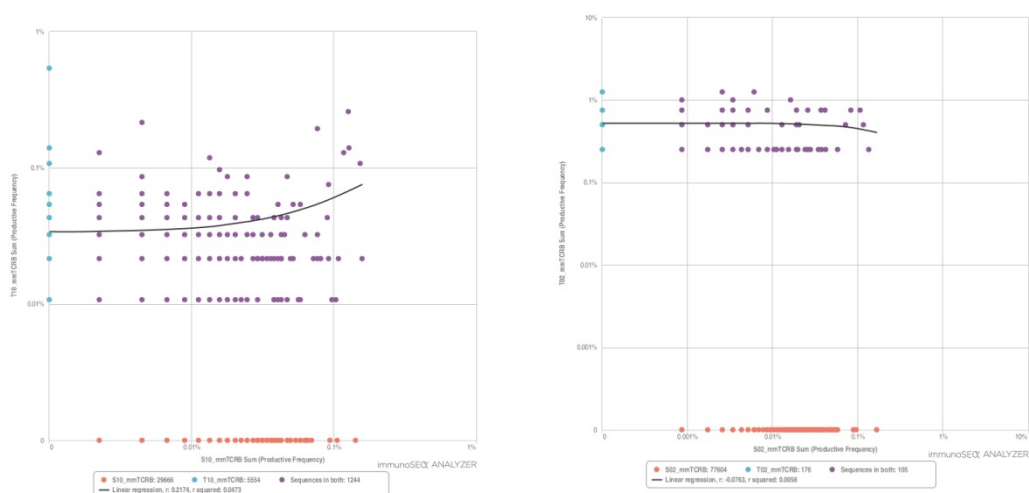


Figura 32. Diagramas de dispersión log10 de las secuencias del TCR compartidas entre las muestras tumorales y la sangre periférica. En rojo: secuencias identificadas sólo en sangre; en azul: secuencias identificadas sólo en el tumor; en morado: secuencias identificadas en ambas muestras. La línea negra muestra la regresión lineal. a) relación en el ratón movilizado (ratón 10); b) relación en el ratón no movilizado (ratón 02).

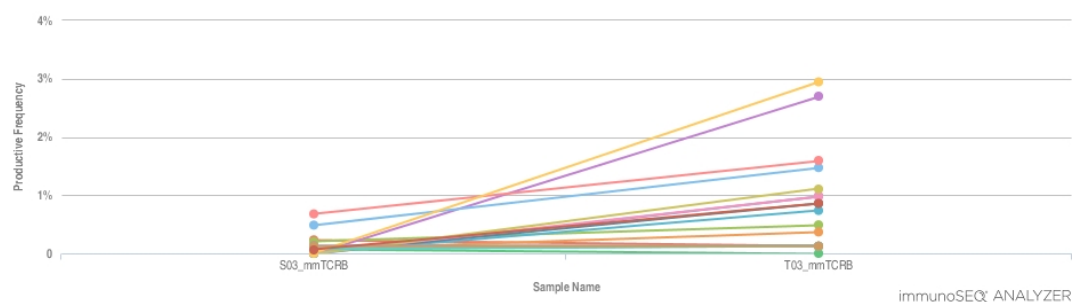


Figura 33. Relación gráfica de las secuencias de TCR compartidas entre la sangre periférica y el tumor en el ratón 03, no movilizado.

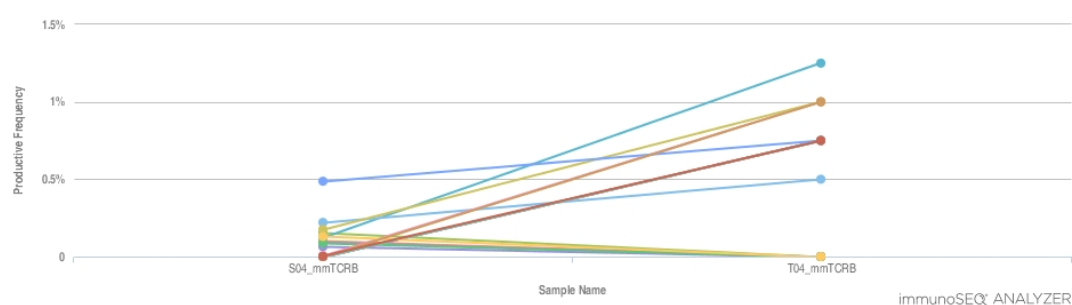


Figura 34. Relación gráfica de las secuencias de TCR compartidas entre la sangre periférica y el tumor en el ratón 04, no movilizado.

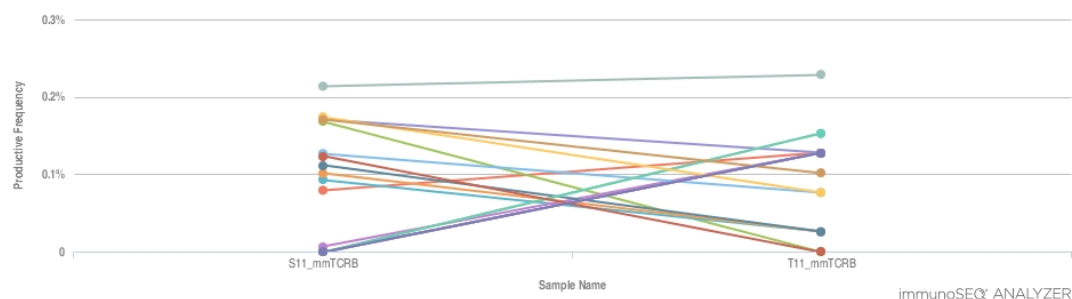


Figura 35. Relación gráfica de las secuencias de TCR compartidas entre la sangre periférica y el tumor en el ratón 11, movilizado.

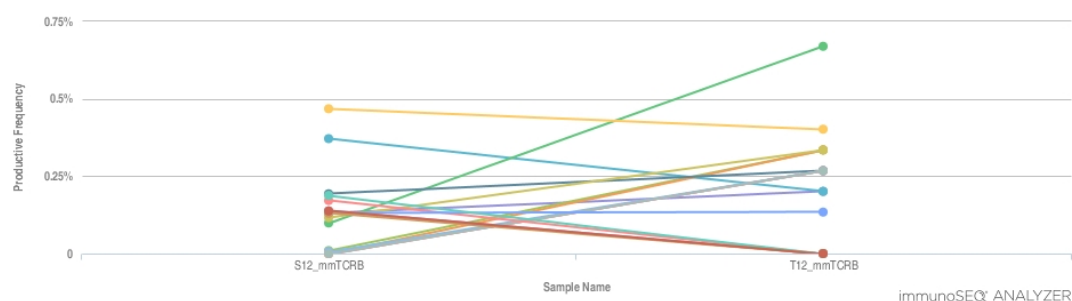


Figura 36. Relación gráfica de las secuencias de TCR compartidas entre la sangre periférica y el tumor en el ratón 12, movilizado.

4.4. FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS CIRCULANTES QUE INCLUYEN TILs EN CULTIVO

IN VITRO

Tras confirmar en el modelo murino la existencia de TILs en sangre periférica y observar una tendencia positiva a su movilización con altas dosis de G-CSF, quisimos comprobar la posible funcionalidad antitumoral de estas células circulantes. Como paso previo, realizamos diferentes experimentos para establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de los linfocitos T del ratón.

Los linfocitos T murinos obtenidos mediante suspensión celular del bazo de ratones 129/SvJ se cultivaron y expandieron según diferentes protocolos. A diferencia de las rosetas características que forman los cultivos celulares de linfocitos humanos, en los cultivos de linfocitos de ratón 129/SvJ dichas poblaciones crecieron en agrupaciones sin una forma determinada.

Protocolos establecidos de expansión de linfocitos utilizan la IL-2 para la expansión de estas células en cultivo *ex vivo*. En nuestro caso, dada la falta de bibliografía en relación a la expansión *in vitro* de linfocitos T de ratones 129/SvJ, realizamos experimentos con diferentes concentraciones de IL-2 humana con el objetivo de conocer cuál constituía el estímulo más eficaz.

4.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO *IN VITRO* DE LINFOCITOS MURINOS

Con la utilización de IL-2 humana observamos una escasa supervivencia del cultivo, siendo la concentración que demuestra un mejor perfil la de 50 UI/ml con una expansión de 1,3 veces respecto al control con PHA a los 14 días, mientras que es menor para las concentraciones de 5 UI/ml (0,33 veces) y 500 UI/ml (0,71 veces) y similar al control para la concentración de 10 UI/ml (1 vez) (figura 37).

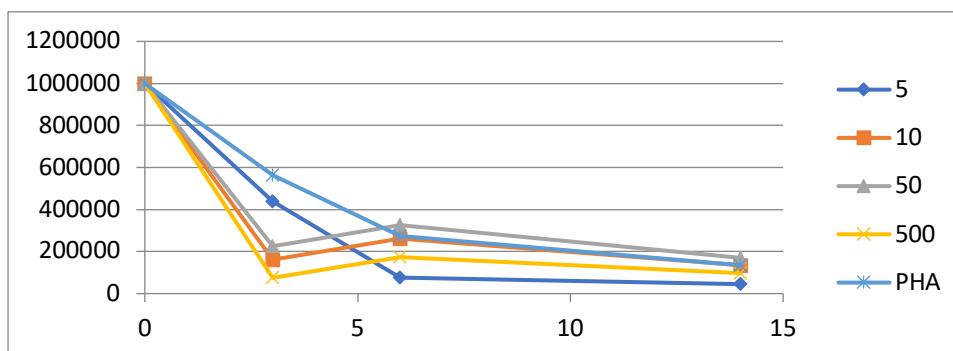


Figura 37. Evolución temporal de los cultivos de linfocitos T con diferentes concentraciones de IL-2 humana.

Dada la falta de expansión de los cultivos de linfocitos T de ratones 129/SvJ en dichas condiciones, decidimos analizar la expansión de los linfocitos *in vitro* con IL-2 humana e IL-2 murina recombinante (figura 38).

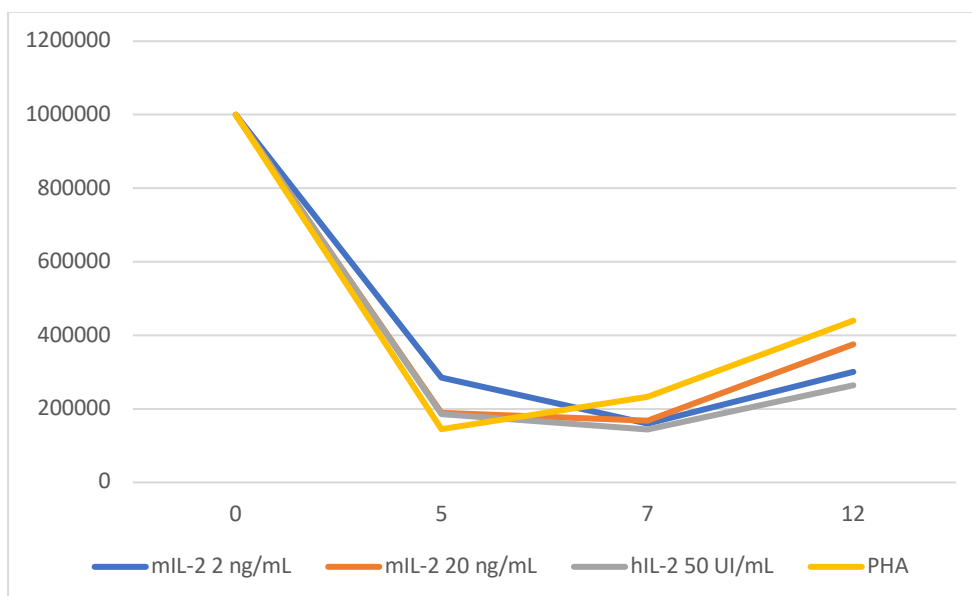


Figura 38. Evolución temporal de los cultivos de linfocitos T *in vitro* con diferentes concentraciones de IL-2 humana e IL-2 murina recombinante.

Observamos que la utilización de IL-2 permite la selección de una población CD3⁺, siendo mayor dicha selección para la IL-2 humana a dosis de 50 UI/ml (13,2 %) frente a la IL-2 murina (11,5% para 2 ng/ml; 8,9% para 20 ng/ml) y frente al control mediante PHA (7,7%) a los 12 días de cultivo (figuras 39 y 40).

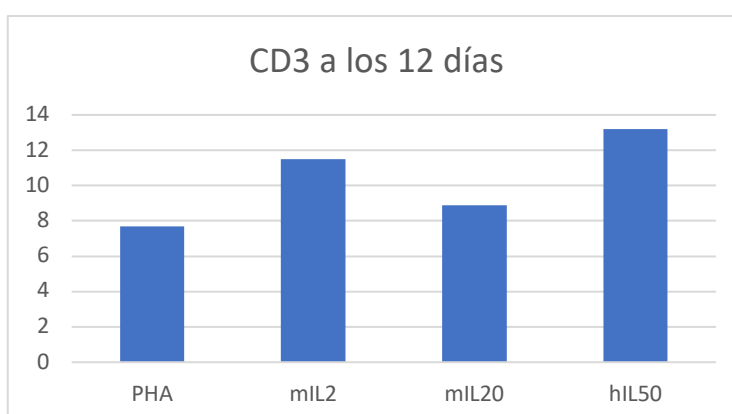


Figura 39. Porcentaje de linfocitos CD3 en cultivo *in vitro* según diferentes concentraciones de IL-2 humana o murina recombinante respecto al control con PHA. Control con PHA; mL2: IL-2 murina recombinante a 2 ng/ml; mL20: IL-2 murina recombinante a 20 ng/ml; hIL50: IL-2 humana a 50 UI/ml.

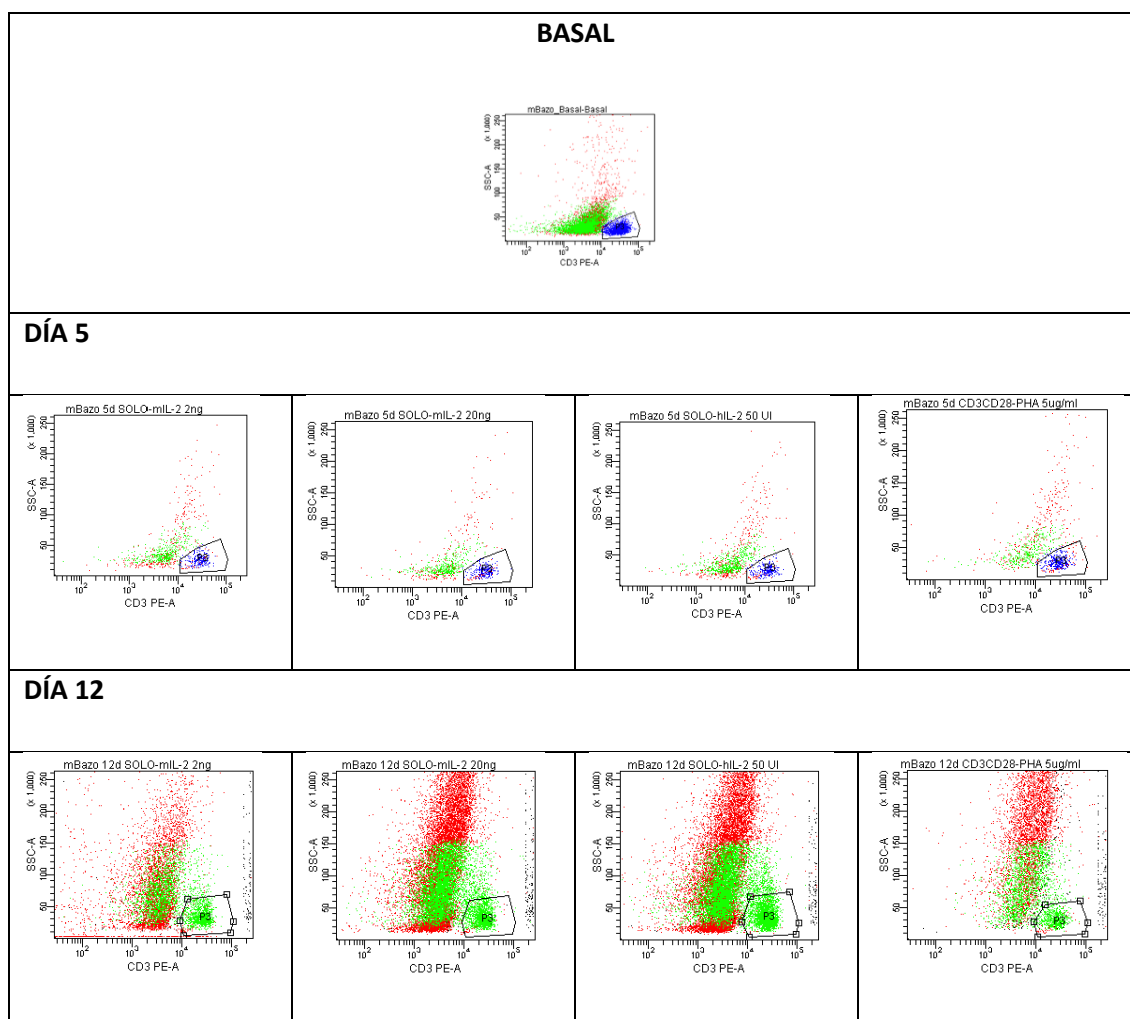


Figura 40. Evolución de la citometría de flujo de los cultivos *in vitro* de linfocitos de ratón a los 5 y a los 12 días. De izquierda a derecha: mIL-2 a 2 mg/ml; mIL-2 a 20 mg/ml; hIL-2 a 50 UI/ml; control con PHA.

4.5. CAPACIDAD FUNCIONAL DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA QUE INCLUYEN TILs FRENTE A CÉLULAS TUMORALES

Finalmente, diseñamos un experimento funcional para detectar y cuantificar la presencia de linfocitos T circulantes en sangre periférica que hubieran sido primados contra neuroblastoma correspondientes, por tanto, a TILs anti-neuroblastoma. Se establecieron dos grupos, cada uno constituido por 4 ratones WT 129/SvJ inmunocompetentes con implante ortotópico de neuroblastoma. Tras tres semanas, en el grupo movilizado se aplicó el protocolo

a altas dosis de Neupogen® con bomba osmótica tal como se describe en Material y Métodos (figura 41).

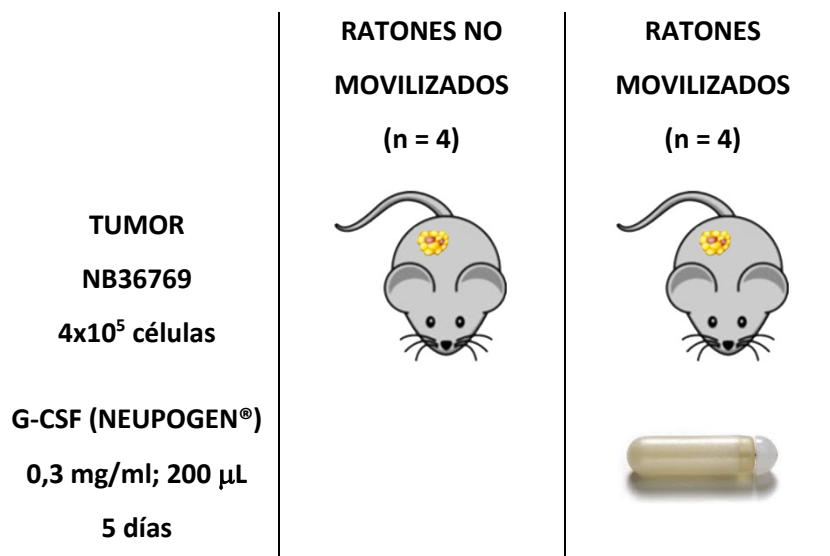


Figura 41. Esquema indicativo del experimento para movilización de TILs mediante utilización de bombas osmóticas.

Las muestras de sangre periférica fueron procesadas para eliminar el componente eritrocitario y se realizó una purificación de la fracción linfocitaria mediante columnas magnéticas para suprimir el componente *naïve* (CD62L) según se describe en Material y Métodos. Posteriormente, se marcaron con CFSE y se co-cultivaron con neuroesferas NB36769 a dos ratios diferentes de 1:1 y 1:10 (neuroesferas:linfocitos).

4.5.1. LA MOVILIZACIÓN CON G-CSF FAVORECE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA QUE INCLUYEN TILs AL CO-CULTIVARLOS CON CÉLULAS TUMORALES A UNA RATIO 1:1

Los cultivos de linfocitos T se valoraron a las 24, 48 y 72 horas mediante citometría de flujo en base a la dilución de CFSE. Se observó una mayor proliferación, determinada por una mayor fracción de linfocitos T que realizaron dos o más divisiones, en los cultivos celulares provenientes de ratones movilizados con Neupogen® cuando se cultivaron a un ratio 1:1 (neuroesferas:linfocitos) (figura 42).

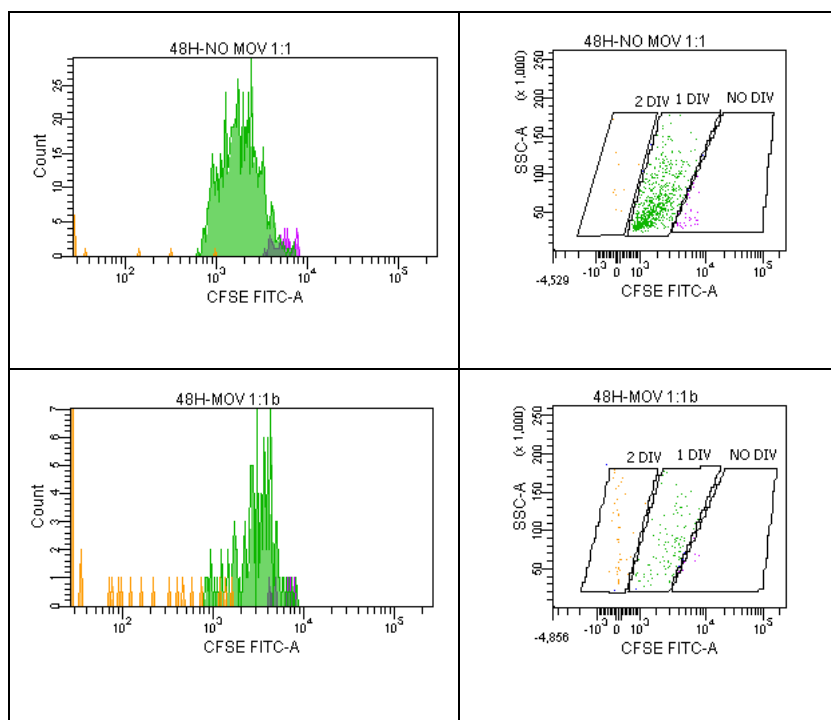


Figura 42. Características por citometría de flujo de la proliferación clonal de linfocitos T circulantes en sangre periférica según la dilución de CFSE a las 48 horas en co-cultivos con neuroesferas. NO MOV 1:1: cultivos de ratones no movilizados a ratio 1:1; MOV 1:1b: cultivos de ratones movilizados a ratio 1:1.

De esta manera, desde el análisis de las primeras 24 horas, se observa que los cultivos provenientes de ratones movilizados con un ratio 1:1 mostraron un mayor porcentaje de linfocitos T que realizaron dos o más divisiones (7,85%) frente a los cultivos de linfocitos circulantes de ratones no movilizados a ratio 1:1 (1,1%), a ratio 1:10 (0,55%) y de ratones movilizados a ratio 1:10 (1,6%) (p valor = 0,103) (figura 43).

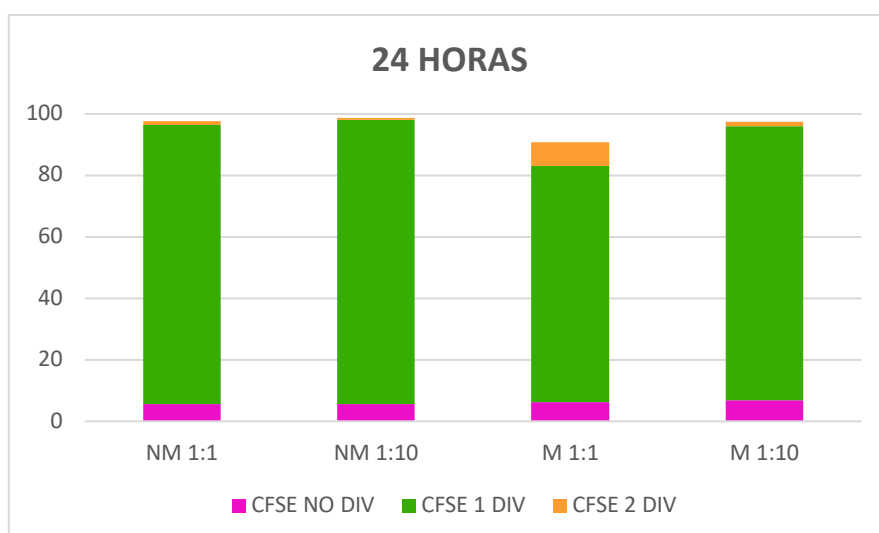
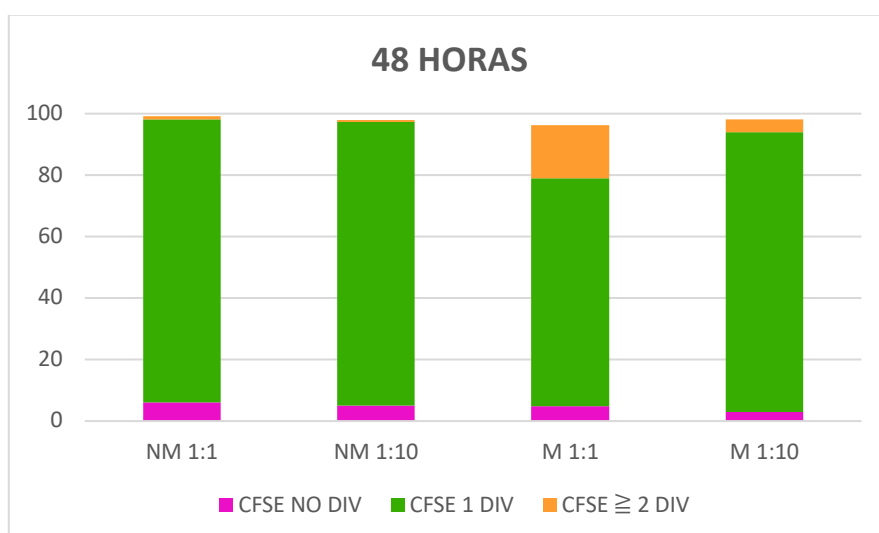


Figura 43. Porcentajes de división de los linfocitos T en los co-cultivos con neuroesferas. Proporción de linfocitos que no realizaron ninguna división (en rosa); proporción de linfocitos que realizaron una división (en verde); y proporción de linfocitos que realizaron dos o más divisiones (en naranja). De izquierda a derecha: NM 1:1; NM 1:10; M 1:1; M 1:10. NM: ratones no movilizados; M: ratones movilizados.

Cuando analizamos la evolución de los cultivos a las 48 y 72 horas, se comprueba que esta tendencia continúa, pasando el porcentaje de linfocitos que realizaron dos o más divisiones de 17,4% a las 48 horas (p valor = 0,103), a 27,9% a las 72 horas en los cultivos de ratones movilizados a ratio 1:1. Sin embargo, para los cultivos de ratones no movilizados a ratio 1:1 este asciende a 8,9% a las 72 horas; a ratio 1:10 asciende tan sólo a 1,2% y para los cultivos de ratones movilizados a ratio 1:10 hasta 5,3% (p valor = 0,232) (figuras 44 - 46).



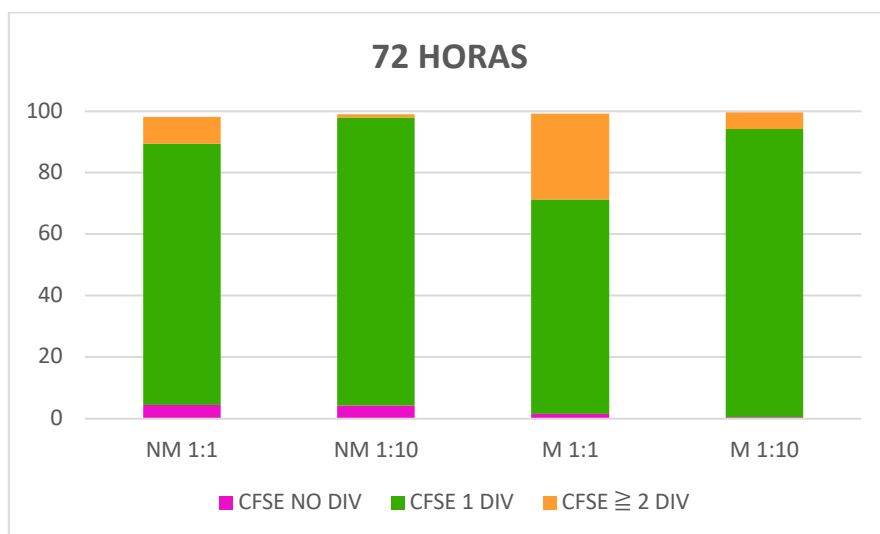


Figura 44 y 45. Porcentajes de división de los linfocitos T en los co-cultivos con neuroesferas. Proporción de linfocitos que no realizaron ninguna división (en rosa); proporción de linfocitos que realizaron una división (en verde); y proporción de linfocitos que realizaron dos o más divisiones (en naranja). De izquierda a derecha: NM 1:1; NM 1:10; M 1:1; M 1:10. NM: ratones no movilizados; M: ratones movilizados.

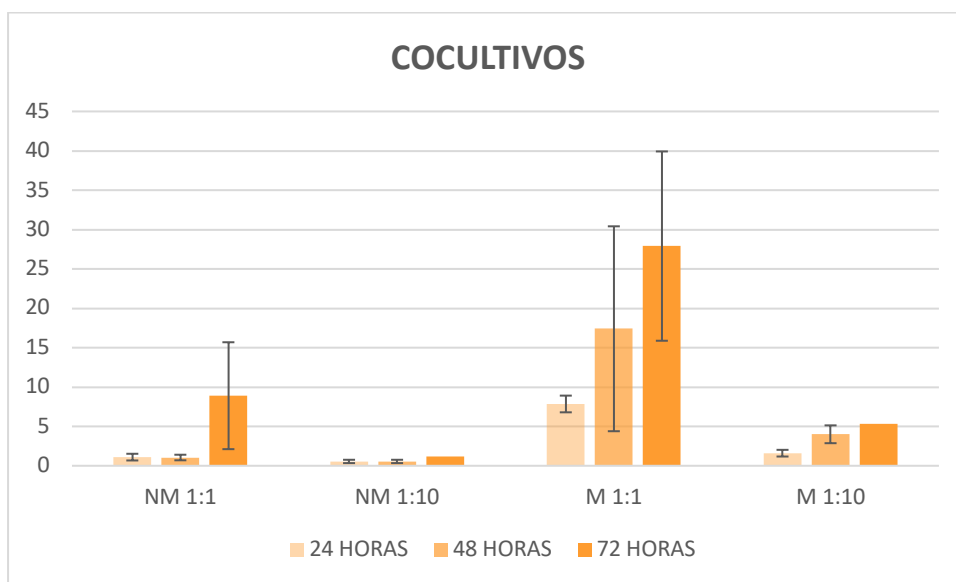


Figura 46. Porcentajes de linfocitos que realizaron dos o más divisiones en los co-cultivos con neuroesferas a las 24, 48 y 72 horas (en naranja, de más claro a más oscuro, respectivamente). De izquierda a derecha: NM 1:1; NM 1:10; M 1:1; M 1:10. NM: ratones no movilizados; M: ratones movilizados.

Estos resultados sugieren que la movilización con un protocolo a altas dosis de G-CSF en ratones inmunocompetentes portadores de neuroblastoma promueve un aumento de linfocitos circulantes en sangre periférica que contienen TILs contra el neuroblastoma al observar un aumento de la proliferación clonal de estas células al co-cultivarlas con sus células diana a un ratio 1:1.

5. DISCUSIÓN

En 1863, el patólogo alemán Rudolf Virchow describió por primera vez la existencia de leucocitos en muestras tumorales. En los años posteriores, diferentes estudios en distintos tumores demostraron una correlación entre la infiltración de los tumores por estas células y un pronóstico favorable, dando lugar a la idea del papel protector del sistema inmune como mecanismo de defensa contra el cáncer^(58,59). En 1964 el Dr. P. Alexander publicó el primer trabajo acerca de la utilización de TILs en el tratamiento del cáncer en ratas⁽⁷⁰⁾. Nació así el concepto conocido actualmente como terapia celular adoptiva. Sin embargo, la falta del conocimiento suficiente para aislar y expandir dichas células impidió el uso de éstas como terapia hasta los años 80. El trabajo del Dr. S. Gillis publicado en 1977 estableció las bases para el cultivo de TILs⁽⁷¹⁾, pero, sin embargo, fueron los resultados del Dr. Steve Rosenberg los que abrieron el camino para la utilización de los TILs como herramienta terapéutica al desarrollar un método de expansión *in vitro* de linfocitos aislados de muestras tumorales de ratones al cultivarlos con IL-2, que podían utilizarse de forma eficaz para el tratamiento del cáncer avanzado en los animales⁽⁶⁶⁾.

En el caso de los tumores infantiles, la caracterización fenotípica y funcional de estas poblaciones inmunes está escasamente descrita en la literatura debido a que los primeros intentos de simular resultados similares a los obtenidos en tumores de adultos fueron negativos, al mostrar una pobre viabilidad y especificidad de los TILs, con la consecuente dificultad para expandir estas células en un momento en el que la tecnología se encontraba en sus fases más preliminares⁽⁹³⁾. Este hecho ha conllevado en la actualidad una práctica inexistente experiencia de la posible aplicación clínica de los TILs para el tratamiento de tumores sólidos pediátricos en favor de otras estrategias de inmunoterapia celular como son las células T CAR o con TCR transgénico⁽⁸⁶⁾. Sin embargo, en neuroblastoma, el grupo del Dr. Vito Pistoia describió la presencia de un infiltrado de TILs tanto CD4 como CD8 obtenidos de tumores de pacientes, con capacidad de expresar IFN γ , IL-4, IL-5, TNF α , IL-8, IL-10, de expandirse en cultivo con IL-2 y con actividad citotóxica frente a líneas tumorales⁽⁹⁰⁾. De manera similar, otro estudio demostró la capacidad citolítica de TILs obtenidos de pacientes frente a células tumorales de neuroblastoma⁽⁹¹⁾. Además, la presencia de infiltrado por estas células linfoides en una muestra extensa de niños con neuroblastoma se asoció con un pronóstico más favorable⁽⁹²⁾.

Los TILs han demostrado ser una herramienta terapéutica útil en el tratamiento de tumores como el melanoma⁽⁷⁷⁾. Por otra parte, el auge en los últimos años del conocimiento de la respuesta inmune antitumoral con la aparición de diferentes estrategias de inmunoterapia ha permitido mejorar el pronóstico de los pacientes con neuroblastomas de alto riesgo⁽²⁵⁾. Sin embargo, a pesar de compartir un origen embriológico común con los melanocitos, son escasos

los trabajos publicados actualmente que hayan investigado el potencial terapéutico de los TILs en el caso del neuroblastoma. Una de las razones es la dificultad para aislar y expandir estas células que requiere, además en este caso, de procedimientos invasivos para la obtención de tejido tumoral⁽⁸⁶⁾. El material de origen para la fabricación de TILs para ACT en pacientes con cáncer es una muestra primaria del tumor o de una metástasis. Si bien, en pacientes con melanoma metastásico no supone un procedimiento muy agresivo, en el caso de otros tumores, el acceso a lesiones primarias o metastásicas representa una limitación. Se necesita de un procedimiento quirúrgico para obtener dicho material de partida, muchas veces en un paciente que se encuentra en malas condiciones para la agresión que supone una intervención quirúrgica. Además, al tratarse de un tratamiento experimental, sin poder garantizar el resultado positivo de todo el proceso, muchas veces es difícil justificar dicho acto quirúrgico. La búsqueda de fuentes alternativas para la fabricación de esta terapia es, por tanto, muy necesaria. La existencia de TILs circulantes en sangre periférica de pacientes con tumores abre la posibilidad de evitar procedimientos quirúrgicos para obtener el material de inicio para la fabricación de esta terapia^(73,97-102). Según nuestros conocimientos, el abordaje propuesto para aumentar el número de TILs en sangre periférica y, de esta manera, generar una fuente alternativa de estas células para su utilización en ACT no ha sido descrito previamente⁽⁷³⁾.

En este trabajo hemos estudiado la posibilidad de que individuos con neuroblastoma presenten TILs circulantes en sangre periférica. Hemos simulado la situación en un modelo aceptado de esta enfermedad. Para identificar estas células, hemos utilizados varios criterios aplicados a diferentes situaciones experimentales. Por un lado, hemos seguido un criterio inmunofenotípico como es la expresión de PD1 en linfocitos T circulantes. El grupo del Dr. Rosenberg demostró que en el melanoma las células T PD1⁺ en sangre periférica contienen linfocitos T antitumorales, sugiriendo que se trata de una subpoblación circulante de TILs^(99,105,106). En esta misma línea, diferentes trabajos han demostrado que la población de linfocitos T circulantes que expresan PD-1 contienen linfocitos T antitumorales en otro tipo de tumores^(104,121-123). El inmunofenotipo de estas células circulantes se caracteriza por ser CD3⁺, con subpoblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ que expresan además moléculas como PD-1, por lo que pueden ser reconocidas mediante el análisis de antígenos de superficie por citometría de flujo^(63,120,124,125). La implicación pronóstica de los linfocitos T PD1⁺ en sangre periférica es aún desconocida. Los datos obtenidos de la literatura son escasos y arrojan resultados controvertidos. Los trabajos existentes realizados en cáncer de pulmón, linfomas, osteosarcoma o carcinoma renal presentan resultados contradictorios respecto a la relación entre un aumento de la proporción de linfocitos PD1⁺ y un mejor o peor pronóstico debido principalmente al

pequeño tamaño de las cohortes analizadas, por lo que son necesarios más estudios^(97,98,103,126-130).

Este es el primer trabajo que analiza la existencia de estas células en la sangre periférica de un modelo experimental de neuroblastoma. La existencia de TILs PD1⁺ circulantes en sangre periférica en pacientes con cáncer ha sido escasamente estudiada y no se ha descrito previamente en el caso del neuroblastoma⁽⁹⁷⁻¹⁰²⁾. En los escasos ejemplos existentes en la literatura, destaca el trabajo llevado a cabo por Waki K y cols. en CPNM que mostró también un componente mayoritario en sangre periférica de linfocitos T CD4⁺PD1⁺ con un fenotipo efector-memoria (CD45RA⁺CCR7⁺; en el ratón las células asimilables son aquellas CD62L⁺). A pesar de que existen pocos datos del perfil funcional de los linfocitos T PD1⁺ en sangre periférica, este trabajo sugiere que éstos podrían tratarse de células con capacidad efectora que no sufren un estado de agotamiento al disminuir la presencia de PD-L1 en sangre periférica respecto al microambiente tumoral⁽⁹⁷⁾. De la misma manera, el grupo de Zheng H confirmó en un estudio similar esta mayor proporción de linfocitos T CD4⁺PD1⁺ en la sangre periférica de pacientes con CPNM⁽⁹⁸⁾. Por otra parte, estudios realizados en melanoma han confirmado la existencia de un infiltrado mayoritario de TILs CD8⁺PD1⁺ en las muestras tumorales, siendo minoritarios en sangre periférica^(63,102). Además, al contrario de lo que ocurre con los linfocitos T CD4⁺PD1⁺ de la sangre periférica, los TILs CD8⁺PD1⁺ muestran un estado de agotamiento con una función efectora alterada en probable relación con el incremento de moléculas inhibitoras como PD-L1 en el microambiente tumoral⁽⁶³⁾. Una hipótesis posible que podría explicar este escenario consistiría en el reclutamiento dentro del tumor de TILs CD8⁺PD1⁺, situación que se ha confirmado en pacientes que recibieron vacunas peptídicas personalizadas en el caso de cáncer de próstata⁽¹²⁶⁾. Estos datos se correlacionan con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, en los que la subpoblación CD4⁺PD1⁺ siempre excedió a la de CD8⁺PD1⁺, tanto en modelo inmunodeficiente con tumor implantado (la única fuente posible de linfocitos T circulantes fueron los TILs) como en modelo inmunocompetente portador de neuroblastoma.

Otro criterio que hemos utilizado para identificar la presencia de TILs circulantes es la similitud de secuencias génicas (y de aminoácidos) en la región 3 hipervariable determinante de la complementariedad (CDR3: *complementarity determining region 3*) de la cadena β del TCR^(85,116,117,131-136). Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación de nueva generación, basadas en la amplificación masiva de la región CDR3 del TCR β , hoy en día es posible conocer las secuencias de nucleótidos que conforman esta región del TCR β de los linfocitos T presentes en una muestra aunque se encuentren en una frecuencia baja^(116,131). En los últimos años, los avances en las técnicas de secuenciación han permitido la caracterización del repertorio clonal

del TCR a niveles que posibilitan detectar y rastrear por el organismo células T específicas⁽¹³²⁾. Esta estrategia nos ha permitido identificar la existencia de linfocitos T circulantes y TILs (muestras pareadas de sangre periférica y tumor de ratones portadores de neuroblastoma) que presentan las mismas secuencias en su TCR β , apoyando la posibilidad de que se traten de células del mismo clon en dos localizaciones anatómicas diferentes.

La existencia de una expansión clonal de subpoblaciones de linfocitos T en diferentes tipos de tumores en comparación con la distribución de estas células en la sangre periférica o en otros tejidos ha sido ampliamente descrita en la bibliografía^(85,131–134). Sin embargo, en el caso del neuroblastoma, no existen muchas publicaciones que hayan analizado el repertorio del TCR de los TILs. En un estudio en el que se analizó la región CDR3 de los TILs de 6 pacientes con neuroblastomas, la mitad de ellos presentó una marcada expansión clonal de linfocitos T no observada en la sangre, aunque este trabajo se realizó con técnicas de secuenciación antiguas⁽¹³⁵⁾. Nosotros hemos encontrado también una situación de oligoclonalidad en los TILs respecto a la sangre periférica. En el análisis de los 10 clones más frecuentes de las muestras tumorales, encontramos un enriquecimiento de clonotipos dentro del tejido tumoral del neuroblastoma. Es necesario tener en cuenta que en la diversidad del repertorio de TCR de las subpoblaciones que componen los TILs existen factores aún desconocidos que generan una amplia variabilidad. Esta amplia variabilidad se ejemplifica en las diferencias encontradas en dicho repertorio entre el tumor primario y las metástasis o en la enorme heterogeneidad entre tumores de histologías distintas^(131,133). En el caso de los modelos murinos de cáncer, la información disponible con respecto al repertorio de TCR es muy limitada⁽¹³²⁾. Los escasos estudios realizados, han demostrado una enorme variabilidad de la clonalidad entre diferentes ratones del mismo modelo. Sin embargo, se ha observado la existencia de ciertos reordenamientos de TCR compartidos entre varios animales que podrían traducir una respuesta común de las células T a proteínas específicas del tumor^(134,136).

En nuestro estudio, acorde a la literatura, no hemos encontrado secuencias compartidas por todos los tumores analizados. Sin embargo, existen dos secuencias compartidas por tres de las muestras tumorales y cinco por dos de los animales. La existencia de secuencias clonoespecíficas similares en los linfocitos T de diferentes animales que comparten los antígenos del MHC, sugiere que dichas subpoblaciones de linfocitos T se han expandido frente a un antígeno que comparten los diferentes individuos y es presentado por las moléculas del MHC. Por tanto, podrían corresponder con clones específicos de tumor contra antígenos específicos de neuroblastoma en este modelo murino.

Actualmente, sabemos que existen ciertos antígenos peptídicos expresados exclusivamente por las células tumorales, los denominados antígenos asociados a tumor o TAAs⁽⁶⁷⁾. En el caso de los tumores y líneas celulares de neuroblastomas humanos se ha comprobado la expresión de los genes MAGEA1 (de sus siglas en inglés, *melanoma antigen-1 gene*), MAGEA3, MAGEA6, CTAG1B y survivina. Sin embargo, aunque se ha demostrado la posibilidad de utilizar estos antígenos para generar *in vitro* linfocitos con capacidad citotóxica frente a células de neuroblastoma a partir de células T de donantes sanos, no existe evidencia actual de una respuesta inmune espontánea contra estos antígenos⁽⁹⁴⁾. La relevancia de nuestros resultados en relación a estos hallazgos consiste en la demostración *in vivo* de la posible existencia de una respuesta frente a antígenos comunes expresados por el neuroblastoma y que podrían ser de utilidad para el rastreo de las células T responsables de esta respuesta, además de para su reconocimiento y utilización como ACT.

Por todo lo expuesto, el análisis del repertorio de TCR intratumoral de pacientes con neuroblastoma mediante técnicas NSG podría permitir un mejor entendimiento de la diversidad del infiltrado tumoral por TILs, su grado de reactividad y su antígeno-especificidad.

Una vez comprobada la existencia de TILs circulantes en nuestro modelo animal, hemos estudiado la posibilidad de incrementar el número de dichas células. Sería muy deseable incrementar esta cantidad como material de inicio, por lo que el problema se centraría ahora en la movilización de los TILs hacia la sangre, de manera similar a lo que se conoce de los progenitores hematopoyéticos en el caso de los trasplantes^(137,138). Este tipo celular circula en pequeñas proporciones en la sangre periférica, pero su proporción puede ser incrementada, o movilizada, por diferentes estímulos. Entre ellos, el más utilizado actualmente es el G-CSF por su potencia y falta de toxicidad grave. Los mecanismos que subyacen a esta movilización de PH constituyen un complicado proceso que involucra cambios tanto en el microambiente de la médula ósea (liberación de proteasas, modulación de la expresión de SDF-1...) como en moléculas expresadas por los PH (VLA-4, VCAM-1, receptores hialurónicos...) y que interaccionan según un modelo en el que el primer paso consistiría en la activación de células hematopoyéticas maduras que darían lugar, en una segunda fase, a la producción de señales secundarias por estas células activadas generando los cambios en el microambiente de la médula ósea que permitirían la movilización de los PH⁽¹³⁹⁾. Dado que no existe experiencia previa en movilización de linfocitos, hemos utilizado la estrategia de uso clínico como aproximación, por su potencial traslacional.

Observamos en los experimentos con ratones inmunocompetentes que la movilización de linfocitos T que incluyen TILs (linfocitos T que expresan PD-1) a sangre periférica con G-CSF es dosis dependiente, de tal manera que la proporción de linfocitos T aumentó al utilizar una dosis mayor de G-CSF. Además, en concordancia con los resultados previos, el componente linfocitario movilizado a sangre periférica estaba compuesto principalmente por linfocitos T $CD4^+PD1^+$, mientras que la subpoblación $CD8^+PD1^+$ es minoritaria. No existen trabajos previos que hayan analizado este posible abordaje como herramienta terapéutica o como posible fuente de TILs para la realización de ACT. Experiencias que podrían asimilarse pueden encontrarse en la utilización de vacunas peptídicas personalizadas. En el trabajo llevado a cabo por Waki K y cols. en el que se analizaron las proporciones de linfocitos PD-1 en muestras de sangre periférica de pacientes con CPNM antes y después de la vacunación en el contexto de un ensayo clínico fase II, se observó un aumento de las células T $CD4^+PD1^+$, con una disminución de los linfocitos T $CD8^+PD1^+$, presentando ambos hallazgos una correlación pronóstica positiva con la supervivencia general⁽⁹⁷⁾.

Por otra parte, los ratones que habían recibido Neupogen® presentaron un mayor número de clonotipos comunes, estando estos clones dentro de los 10 más frecuentes de las muestras tumorales. Aunque las diferencias no alcanzan la significación estadística, probablemente por el pequeño número de muestras analizadas, sí que podemos ver una tendencia positiva en la regresión lineal. Lo interesante de estos hallazgos radica en que podrían estar en relación con la habilidad de expansión de los clones específicos de tumor y su movilización a sangre periférica, ya que no existen hasta la fecha publicaciones que hayan abordado la posibilidad de aumentar y reconocer la proporción de TILs en sangre periférica mediante la administración de G-CSF. La mayoría de los artículos publicados han mostrado un inexistente o mínimo solapamiento entre el repertorio de TCR de los TILs y las células de la sangre periférica de pacientes con diferentes tipos de tumores. Este hecho podría explicarse por el rápido recambio de las células en la sangre y por la realización de análisis de una fracción del conjunto total de las células⁽¹³³⁾. Sin embargo, con la mejora de las técnicas de secuenciación, actualmente es posible monitorizar en sangre periférica la dinámica de las células T utilizadas en ACT o analizar la repercusión de las estrategias de inmunoterapia en el repertorio de TCR en sangre periférica y su posible implicación pronóstica^(131–134). Existen resultados contradictorios, dependiendo del modelo utilizado, acerca de si los tratamientos de inmunoterapia (utilización de bloqueadores de puntos de control, administración de sustancias como IL-2, IL-7...) producen un incremento de la diversidad de clonotipos o tan sólo un aumento de células con clonotipos

similares, pero con una mayor capacidad efectora. En el caso de la administración de G-CSF, nuestros resultados parecen indicar que no existe una modificación de la clonalidad del TCR.

Como hemos visto, el grupo del Dr. Rosenberg ha demostrado recientemente la posibilidad de identificar una respuesta inmune antitumoral específica de cada paciente mediante la identificación de células T PD1⁺ en sangre periférica⁽⁹⁹⁾. Nuestros resultados por citometría de flujo corroboran la presencia de subpoblaciones que pueden contener linfocitos T antitumorales (PD1⁺) en la sangre periférica de los ratones portadores de neuroblastoma. Además, mediante la inmunosecuenciación del infiltrado tumoral, de manera similar al trabajo realizado por Gros y cols., hemos podido comprobar la existencia de clonotipos compartidos entre las muestras pareadas de tumor y sangre periférica, lo que refuerza la hipótesis de la circulación por el organismo de las células T implicadas en la respuesta inmune antitumoral también en el caso del neuroblastoma. La administración de G-CSF parece aumentar dicha proporción sin modificar el repertorio del TCR contra el neuroblastoma en el modelo estudiado.

El estudio de clonalidad en ratones movilizados, muestras pareadas de tumor y sangre periférica, mostró que la proporción que representaban los 10 clones más frecuentes en las muestras tumorales de los ratones sometidos al protocolo de movilización con G-CSF era menor que en los no movilizados. Sin embargo, al intentar correlacionar esta disminución en los tumores con un aumento de la representación de los clones más frecuentes en las muestras pareadas de sangre periférica, no encontramos ninguna correspondencia. Ante este hallazgo nos planteamos tres posibilidades. En primer lugar, estos hallazgos podrían sugerir un aumento del infiltrado linfocitario inespecífico intratumoral secundario a la utilización de Neupogen® que favoreciera una disminución de la proporción de los clones más frecuentes. Otra opción podría consistir en la modificación de la diversidad del repertorio del TCR del infiltrado intratumoral debido a la aplicación de Neupogen®. Finalmente, cabría la posibilidad de que los clones de linfocitos fueran movilizados a otros órganos como, por ejemplo, el bazo. Actualmente, existen todavía muchos aspectos desconocidos acerca de la influencia de la diversidad del repertorio de TCR en la respuesta inmune antitumoral. Aunque no podemos asegurar con los datos presentados cuál es el escenario provocado por la administración de G-CSF, dado que parece existir una tendencia a movilizar linfocitos T que incluyen TILs a sangre periférica, como puede observarse en las representaciones gráficas de las secuencias compartidas, podría, de la misma manera, aumentar también el infiltrado inespecífico en el tumor.

Si el protocolo de movilización utilizado resulta en un incremento de los linfocitos T antitumorales circulantes, un ensayo sobre la capacidad funcional de los linfocitos T movilizados

a sangre periférica frente a las células tumorales puede confirmar dicha hipótesis. Para evitar la posibilidad de activación inespecífica de la población de linfocitos T *naïve*, tuvimos la precaución de trabajar sólo con poblaciones de linfocitos T memoria, que deben contener a las subpoblaciones previamente primadas con antígenos tumorales en el caso de los TILs. Obtuvimos como resultado que existía una mayor proliferación, determinada por una mayor fracción de linfocitos T que realizaron dos o más divisiones, en los co-cultivos provenientes de los ratones en los que se aplicó el protocolo de movilización con Neupogen®. Los resultados sugieren un aumento de la presencia de TILs con memoria antitumoral en sangre periférica en los ratones portadores de neuroblastoma sometidos a un protocolo de movilización con G-CSF. Estos hallazgos constituyen un primer indicio de la posibilidad de aumentar en sangre periférica la cantidad de TILs con capacidad de reconocimiento de sus células tumorales diana mediante la utilización de protocolos de tratamiento con G-CSF ya establecidos en clínica. Nuestros resultados funcionales sugieren que un protocolo basado en G-CSF es capaz de movilizar una cantidad mayor de linfocitos T antitumorales a la sangre periférica, de manera que se podría combinar con procedimientos de aféresis clásicos para su colecta. Esta posibilidad teórica que planteamos en este trabajo no ha sido descrita previamente y podría constituir una fuente alternativa para la obtención de TILs en tumores sólidos que aunara las ventajas de ambos abordajes y disminuyera la morbilidad asociada a los procedimientos invasivos que, en general, son necesarios para el aislamiento de estas células.

Aunque, como hemos dicho, este experimento constituye tan sólo un primer indicio de esta posibilidad teórica, existen múltiples aspectos por dilucidar. Entre ellos, en nuestro experimento no analizamos el inmunofenotipo de las células en proliferación. Nuevamente, existe una falta de literatura en la misma línea de nuestro trabajo para correlacionar la capacidad funcional de los TILs circulantes. Experiencias asimilables como la utilización de vacunas peptídicas mostró un aumento de linfocitos T CD4⁺PD1⁺ circulantes que presentaban una correlación positiva con la respuesta IgG, lo que se traducía en un mejor pronóstico de los pacientes con CPNM. Sin embargo, en ese mismo trabajo no se demostró una correlación con la respuesta citotóxica⁽⁹⁷⁾. Por otra parte, el estudio de los efectos inmunológicos de la utilización de anticuerpos monoclonales inhibidores de PD-1 ha mostrado que hay múltiples mecanismos inmunes implicados a nivel de la sangre periférica y que son responsables del efecto antitumoral de estas terapias. Entre ellos, se ha enfatizado en el papel que los anticuerpos anti-PD-1 juegan en la mejora de la capacidad de expansión y actividad funcional de las células T en la sangre periférica de pacientes con cáncer⁽¹⁴⁰⁾. Si la utilización de G-CSF, además de aumentar la proporción en sangre periférica de linfocitos T que incluyen TILs, favorece la restauración de

estas funciones en los TILs movilizados a sangre periférica y cuál es el perfil funcional y efector de estas células son algunas de las preguntas que futuros estudios deberán clarificar.

Aunque no se trata de un objetivo de esta tesis analizar la posible implicación pronóstica de estos hallazgos, el hecho de que el esquema de tratamiento de los pacientes con neuroblastomas de alto riesgo incluya la utilización de G-CSF genera una serie de incógnitas en relación a los resultados expuestos. Por un lado, está demostrado el beneficio terapéutico de la adición de IL-2 y G-CSF al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GD2. El mecanismo inmune que subyace a esta mejora de la supervivencia general de los pacientes tratados mediante este esquema podría ser el incremento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos⁽²⁵⁾. Sin embargo, la posibilidad de que exista una reactivación general de la respuesta antitumoral con aumento de la producción de citoquinas por los linfocitos T CD4⁺PD1⁺ circulantes y el reclutamiento dentro del tumor de linfocitos T CD8⁺PD1⁺ con capacidad de generar una respuesta efectiva contra las células cancerígenas constituyen un interesante escenario. Aunque es todavía necesario conocer muchos de los aspectos de la respuesta inmune relacionados con la mejora de la supervivencia en pacientes tratados con inmunoterapia (citoquinas, bloqueadores de puntos de control inmune, células T CAR, TILs, etc.), parece haber más evidencia científica que apoye este posible escenario. Además, la demostración en los últimos años de una relación positiva entre el aumento de linfocitos T positivos para PD1 en sangre periférica y estadios más avanzados de la enfermedad en tumores como el melanoma, el osteosarcoma o los gliomas, podría sugerir que la circulación de estas células por el organismo constituye un intento de frenar la diseminación tumoral^(102,130,141).

Existen en nuestro trabajo una serie de limitaciones. En primer lugar, aunque los modelos murinos de cáncer se han utilizado durante décadas para el estudio de la respuesta inmune antitumoral y el desarrollo de estrategias de inmunoterapia en experimentos preclínicos, los datos disponibles respecto a varios aspectos tratados en nuestro trabajo como el repertorio de TCR o los efectos de la aplicación de estímulos como G-CSF son escasos o inexistentes, lo que conlleva una evidente barrera para su correlación con los pacientes y la traslación de los resultados a la práctica clínica⁽¹³²⁾. En segundo lugar, en relación a la caracterización inmunofenotípica, no hemos analizado la expresión de CD39 o CD103, marcadores que en co-expresión identifican la población de TILs CD8 con capacidad antitumoral al destruir las células tumorales autólogas como se ha demostrado en diferentes tumores humanos⁽¹⁴²⁾. Por otra parte, en el estudio de la capacidad funcional de las células T movilizadas, debemos resaltar que en nuestros experimentos no hemos realizado una purificación de linfocitos T PD1 (que incluyen TILs)⁽¹⁴³⁾ en el tumor ni en la sangre periférica, aspecto que sería

de utilidad para conocer la capacidad real de expansión de estas células para servir como fuente de ACT. Por último, se ha realizado un limitado número de casos experimentales debido al importante coste de algunos de los análisis realizados lo que se refleja en la disminución de la potencia estadística para demostrar nuestros resultados. Sin embargo, la observación de las tendencias demostradas en nuestros experimentos nos alienta a continuar con esta línea de investigación previamente no explorada dados los beneficios potenciales que podrían significar para los pacientes pediátricos con neuroblastoma u otros tumores sólidos.

6. CONCLUSIONES

1.- En el modelo murino de neuroblastoma es posible identificar una población de linfocitos T circulantes que pudiera contener linfocitos infiltrantes de tumor, en base a las siguientes características:

- Perfil inmunofenotípico.
- Secuencias clonoespecíficas de los genes del receptor de células T.
- Capacidad proliferativa frente a células tumorales.

2.- Un protocolo de movilización de progenitores hematopoyéticos utilizado en la clínica, basado en la administración de G-CSF, aumenta la cantidad de linfocitos circulantes que contienen linfocitos infiltrantes de tumor. Esto abre la puerta para mejorar la obtención incruenta del material de inicio necesario para terapia celular adoptiva en estos pacientes.

3.- El modelo murino de neuroblastoma puede servir para identificar las secuencias específicas de los receptores de células T anti-neuroblastoma en base a la similitud de secuencias de aminoácidos compartidas por los linfocitos infiltrantes de tumor de varios animales individuales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2018. 2018;68(1):7–30.
2. Madero L, Lassaletta A, Sevilla J, editors. Neuroblastoma. In: Hematología y oncología pediátricas. 3ª edición. España: Ergon; 2015.
3. Seeger R, Brodeur G, Sathere H, Dalton A, Siegel S, Wong K. Association of multiple copies of the N-myc oncogen with rapid progression of neuroblastomas. N Engl J Med. 1985;313:1111–6.
4. Shimada H, Stram DO, Chatten J, Joshi V V, Hachitanda Y, Brodeur GM, et al. Identification of Subsets of Neuroblastomas by Combined Histopathologic and N-myc Analysis. 1995;87(19):1470–7.
5. Matthay K, Villablanca J, Seeger R. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bon marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children’s Cancer Group. N Engl J Med. 1999;341:1165–73.
6. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-kogan D, et al. Long-Term Results for Children With High-Risk Neuroblastoma Treated on a Randomized Trial of Myeloablative Therapy Followed by 13- cis -Retinoic Acid : A Children ’ s Oncology Group Study. 2009;27(7):1007–13.
7. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Database.
8. Kholodenko I V, Kalinovsky D V, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko R V. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. J Immunol Res. 2018;7394268.
9. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. 2007;369.
10. Arendonk KJ Van, Chung D. Neuroblastoma : Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. Child. 2019;6(1).
11. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic Prognostic Factors in Neuroblastic Tumors : Definition of Subtypes of Ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. 1984;73(2):405–16.
12. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi V V, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). Cancer. 1999;86:364–72.
13. Barone G, Anderson J, Pearson ADJ, Petrie K, Chesler L. New strategies in neuroblastoma:

- Therapeutic targeting of MYCN and ALK. Clin Cancer Res. 2013;19(21):5814–21.
14. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus H, Bishop J. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science (80-). 1984;224:1121–4.
 15. Schwab M, Alitalo K, Klemphauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. Nature. 1983;305(5931):245–8.
 16. Westermarck UK, Wilhelm M, Frenzel A, Henriksson MA. The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. Semin Cancer Biol [Internet]. 2011;21(4):256–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.08.001>
 17. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D’Angio G, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol. 1988;6(12):1874–81.
 18. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. J Clin Oncol. 1993;11(8):1466–77.
 19. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse J, Cecchetto G, Holmes K. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System : An INRG Task Force Report. J Clin Oncol. 2009;27(2).
 20. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System : An INRG Task Force Report. J Clin Oncol. 2009;27(2):289–97.
 21. Morgenstern DA, Hogarty MD, Pearson AD, London WB, Bagatell R, Maris JM, et al. The challenge of defining “ultra-high-risk” neuroblastoma. Pediatr Blood Cancer. 2018;66:e27556.
 22. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenbourn SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. J Clin Oncol. 2015;33(27):3008–17.
 23. Kreissman SG, Seeger RC, Matthay KK, London WB, Sposto R, Grupp SA, et al. Purged

- versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(10):999–1008. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70309-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70309-7)
24. Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D, et al. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma : a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2008;9(3):247–56.
 25. Yu A, Gilman A, Ozkaynak M, London W, Kreissman S, Chen H, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324–34.
 26. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson ADJ, Cohn SL, et al. Clinical and Biologic Features Predictive of Survival After Relapse of Neuroblastoma : A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. *J Clin Oncol*. 2011;29(24):3286–92.
 27. Johnsen JJ, Dyberg C, Fransson S, Wickström M. Molecular mechanisms and therapeutic targets in neuroblastoma. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;131:164–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.023>
 28. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, et al. ALK Mutations Confer Differential Oncogenic Activation and Sensitivity to ALK Inhibition Therapy in Neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2014;26(5):682–94.
 29. Brodeur GM, Iyer R, Croucher JL, Zhuang T, Higashi M, Kolla V. Therapeutic targets for neuroblastomas. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(3):277–92.
 30. Matthay KK, George RE, Yu AL. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(10):2740–53.
 31. Zhang L, Vines DC, Scollard DA, Mckee T, Komal T, Ganguly M, et al. Correlation of Somatostatin Receptor-2 Expression with Gallium-68-DOTA-TATE Uptake in Neuroblastoma Xenograft Models. *Contrast Media Mol Imaging*. 2017;9481276.
 32. Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y. Essential Roles of Gangliosides in the Formation and Maintenance of Membrane Microdomains in Brain Tissues. *Neurochem Res*. 2012;37:1185–91.
 33. Wu Z, Schwartz E, Seeger R, Ladisch S. Expression of GD2Ganglioside by Untreated

- Primary Human Neuroblastomas1. Cancer res. 1986;46:440–3.
34. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor – positive T cells in patients with neuroblastoma. Blood. 2011;118(23):1–3.
 35. Pastor ER, Mousa SA. Current management of neuroblastoma and future direction. Crit Rev Oncol Hematol [Internet]. 2019;138(November 2018):38–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.03.013>
 36. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneeskd. 1909;5:273–90.
 37. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. Prog Exp tumor Res Fortschritte der Exp Tumorforschung Prog la Rech Exp des tumeurs. 1970;13:1–27.
 38. Klein G. Tumor antigens. Annu Rev Microbiol. 1966;(20):223–52.
 39. Thomas L. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. In: Lawrence H, editor. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper; 1959. p. 529–32.
 40. Stutman O. Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. Science (80-) [Internet]. 1974 Feb 8;183(4124):534 LP – 536. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/183/4124/534.abstract>
 41. Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. J Natl Cancer Inst. 1979;62(2):353–8.
 42. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991–8.
 43. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Suppression and Promotion. Science (80-). 2011;331:1565–70.
 44. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol. 1994;12:991–1045.
 45. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in Inflammation and

- Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367–88.
46. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. Article NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity*. 2008;28(April):571–80.
 47. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and Cancer: Mechanisms of Tumor Evasion and Strategies for Breaking Tolerance. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1136–51.
 48. Ronald J, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of FoxP3 þ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. *Clin Cancer Res*. 2012;18(11):3022–30.
 49. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12(4):253–68. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri3175>
 50. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol* [Internet]. 2013 Jul 1;228(7):1404–12. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.24260>
 51. Dürr S, Kindler V. Implication of indolamine 2,3 dioxygenase in the tolerance toward fetuses, tumors, and allografts. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2013 May 1;93(5):681–7. Available from: <https://doi.org/10.1189/jlb.0712347>
 52. Raber P, Ochoa AC, Rodríguez PC. Metabolism of L-Arginine by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer: Mechanisms of T cell suppression and Therapeutic Perspectives. *Immunol Invest* [Internet]. 2012 Aug 1;41(6–7):614–34. Available from: <https://doi.org/10.3109/08820139.2012.680634>
 53. Nirschl CJ, Drake CG. Molecular Pathways: Coexpression of Immune Checkpoint Molecules: Signaling Pathways and Implications for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Sep 15;19(18):4917 LP – 4924. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/18/4917.abstract>
 54. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(4):252–64. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
 55. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235–71.

56. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity*. 2013;39:782–95.
57. Galon J, Tartour E, Saute C, Page F. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29:1093–102.
58. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* [Internet]. 2008;454(7203):436–44. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature07205>
59. Schatton T, Scolyer RA, Thompson JF, Mihm MC. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Significance in Melanoma Prognosis BT - Molecular Diagnostics for Melanoma: Methods and Protocols. In: Thurin M, Marincola FM, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 287–324. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-727-3_16
60. Clark Jr WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* [Internet]. 1969 Mar;29(3):705–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5773814>
61. Lee N, Zakka LR, Mihm Jr MC, Schatton T. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology* [Internet]. 2016/01/16. 2016 Feb;48(2):177–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020390>
62. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining ‘T cell exhaustion.’ *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2019;19(11):665–74. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0221-9>
63. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* [Internet]. 2009/05/07. 2009 Aug 20;114(8):1537–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19423728>
64. Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010/03/06. 2010 Apr;22(2):223–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207527>
65. Maccarty W. Factors which influence longevity in cancer: a study of 293 cases. *Ann Surg*. 1922;76(1):9–12.

66. Rosenberg SA, Spiess P, Ilafreniere R. A New Approach to the Adoptive Immunotherapy of Cancer with Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Science* (80-). 1986;233:1318–21.
67. Linette GP, Carreno BM, Linette GP. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Checkpoint Inhibitor Era. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(4):286–91.
68. Robbins PF, Lu Y-C, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* [Internet]. 2013 May 5;19:747. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.3161>
69. Keenan TE, Burke KP, Allen EM Van, Burke KP. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat Med*. 2019;25(3):389–402.
70. Delorme EJ, Alexander P. Treatment of primary fibrosarcoma in the rat with immune lymphocytes. *Lancet* [Internet]. 1964 Jul 18;284(7351):117–20. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)90126-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)90126-6)
71. Gillis S, Smith K. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature*. 1977;268(5616):154–6.
72. Topalian BSL, Solomon D, Avis FP, Chang AE, Freerksen DL, Linehan WM, et al. Immunotherapy of Patients With Advanced Cancer Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Recombinant Interleukin-2: A Pilot Study. *J Clin Oncol*. 1988;6:839–53.
73. Choi BK, Kim S, Kim YH, Kwon BS. Cancer immunotherapy using tumor antigen-reactive T cells. *Immunotherapy*. 2018;10(3):235–45.
74. Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* [Internet]. 1983 Oct 1;158(4):1356 LP – 1361. Available from: <http://jem.rupress.org/content/158/4/1356.abstract>
75. Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M, Doyle M, Kawasaki E, Kohts K, et al. Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science* (80-) [Internet]. 1984 Mar 30;223(4643):1412 LP – 1414. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/223/4643/1412.abstract>
76. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al.

- Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 1985 Dec 5;313(23):1485–92. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM198512053132327>
77. Feldman SA, Assadipour Y, Kriley I, Goff SL, Rosenberg SA. Adoptive Cell Therapy—Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors. *Semin Oncol* [Internet]. 2015;42(4):626–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.005>
78. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008/09/22. 2008 Nov 10;26(32):5233–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809613>
79. Radvanyi LG, Bernatchez C, Zhang M, Fox PS, Miller P, Chacon J, et al. Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012/10/02. 2012 Dec 15;18(24):6758–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23032743>
80. Dudley ME, Gross CA, Langhan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC, et al. CD8+ enriched “young” tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2010/07/28. 2010 Dec 15;16(24):6122–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668005>
81. Dudley ME, Gross CA, Somerville RPT, Hong Y, Schaub NP, Rosati SF, et al. Randomized selection design trial evaluating CD8+-enriched versus unselected tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy for patients with melanoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013/05/06. 2013 Jun 10;31(17):2152–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650429>
82. Yao X, Ahmadzadeh M, Lu Y-C, Liewehr DJ, Dudley ME, Liu F, et al. Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood* [Internet]. 2012/05/03. 2012 Jun 14;119(24):5688–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22555974>
83. Wölfl M, Greenberg PD. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of

- naive, human CD8+ T cells. *Nat Protoc* [Internet]. 2014/03/27. 2014 Apr;9(4):950–66. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675735>
84. Watanabe K, Suzuki S, Kamei M, Toji S, Kawase T, Takahashi T, et al. CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. *Int J Hematol* [Internet]. 2008/08/05. 2008 Oct;88(3):311–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677654>
85. Sensi M, Parmiani G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol Today* [Internet]. 1995 Dec;16(12):588–95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579752>
86. Tesfaye M, Savoldo B. Adoptive Cell Therapy in Treating Pediatric Solid Tumors. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2018 Aug 1;20(9):73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30069644>
87. Hellström IE, Hellström KE, Pierce GE, Bill AH. Demonstration of cell-bound and humoral immunity against neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1968 Aug;60(4):1231–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4299942>
88. Bill AH. The implications of immune reactions to neuroblastoma. *Surgery* [Internet]. 1969 Aug;66(2):415–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5797230>
89. Bill AH, Morgan A. Evidence for immune reactions to neuroblastoma and future possibilities for investigation. *J Pediatr Surg* [Internet]. 1970 Apr;5(2):111–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419066>
90. Facchetti P, Prigione I, Ghiotto F, Tasso P, Garaventa A, Pistoia V. Functional and molecular characterization of tumour-infiltrating lymphocytes and clones thereof from a major-histocompatibility-complex-negative human tumour: neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 1996 Mar;42(3):170–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640845>
91. Kataoka Y, Matsumura T, Yamamoto S, Sugimoto T, Sawada T. Distinct cytotoxicity against neuroblastoma cells of peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes from patients with neuroblastoma. *Cancer Lett* [Internet]. 1993 Sep 15;73(1):11–21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402593>
92. Gambini C, Conte M, Bernini G, Angelini P, Pession A, Paolucci P, et al. Neuroblastic

- tumors associated with opsoclonus-myoclonus syndrome: histological, immunohistochemical and molecular features of 15 Italian cases. *Virchows Arch*. 2003;442(6):555–62.
93. Rivoltini L, Arienti F, Orazi A, Cefalo G, Gasparini M, Gambacorti-Passerini C, et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating paediatric tumours, with a characterization of the tumour phenotype. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 1992;34(4):241–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1311218>
94. Seeger RC. Immunology and immunotherapy of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2011/09/28. 2011 Oct;21(4):229–37. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971567>
95. Richards RM, Sotillo E, Majzner RG. CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Oct 16;9:2380. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459759>
96. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011/04/15. 2011 Jul 1;17(13):4550–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498393>
97. Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, Terazaki Y, Sakamoto S, Matsueda S, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2014/09/23. 2014 Oct;105(10):1229–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117757>
98. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Aug 30;7(35):56233–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191652>
99. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, Pasetto A, Robbins PF, Ilyas S, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med* [Internet]. 2016/02/22. 2016 Apr;22(4):433–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901407>
100. Malaspina TS de S, Gasparoto TH, Costa MRSN, de Melo Jr EF, Ikoma MRV, Damante JH,

- et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2011/03/27. 2011 Jul;60(7):965–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442435>
101. Baruah P, Lee M, Odutoye T, Williamson P, Hyde N, Kaski JC, et al. Decreased levels of alternative co-stimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterise T cells from head and neck cancer patients. *Immunobiology* [Internet]. 2011/11/22. 2012 Jul;217(7):669–75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22204816>
102. Krönig H, Julia Falchner K, Odendahl M, Brackertz B, Conrad H, Muck D, et al. PD-1 expression on Melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease. *Int J cancer* [Internet]. 2012/01/11. 2012 May 15;130(10):2327–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21717461>
103. Arrieta O, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez J-M, Cardona AF, Casas-Ruiz E, Crispín JC, et al. Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 24;8(60):101994–2005. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29254220>
104. Gros A, Tran E, Parkhurst MR, Ilyas S, Pasetto A, Groh EM, et al. Recognition of human gastrointestinal cancer neoantigens by circulating PD-1+ lymphocytes. *J Clin Invest* [Internet]. 2019 Nov 1;129(11):4992–5004. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31609250>
105. Hutchinson L. Immunotherapy: Antitumour T cells as peripheral biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2016/03/15. 2016 Apr;13(4):203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977781>
106. Schumacher TN, Scheper W. A liquid biopsy for cancer immunotherapy. *Nat Med* [Internet]. 2016 Apr;22(4):340–1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050586>
107. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):118–30.
108. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical models for Neuroblastoma: Establishing a baseline for treatment. *PLoS One*. 2011;6(4).

109. Luis AL, Espinoza M, Franco L, González-Murillo A, Melen GJ, Ollero Fresno JC, et al. Establecimiento de un modelo preclínico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes. *Cir Pediatr*. 2016;29(2):66–71.
110. Benavides F, Guénet J. Las líneas genéticamente estandarizadas. In: Benavides F, Guénet J, editors. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio*. 2003. p. 105–24.
111. Romero-Fernandez W, Batista-Castro Z, De Lucca M, Ruano A, García-Barceló M, Rivera-Cervantes M, et al. The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2016;33(2):288–99.
112. Animals L. Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. *Soc Española para las ciencias del Anim Lab* [Internet]. 2001;46. Available from: <http://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-administraci3n-sustancias.pdf>
113. Qiagen. DNeasy® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue. DNeasy® Blood Tissue Handb Purif Total DNA from Anim blood Anim tissue [Internet]. 2006;(July):1–59. Available from: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissuesystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t0>
114. Banco Nacional de ADN S. ADN de pureza óptima ADN pureza aceptable presencia de compuestos aromáticos contaminación con ARN. 2010;2–7. Available from: bancoadn.org
115. Sample M, Guidelines P. Mouse Sample Preparation Guidelines mmTCRB. :1–2.
116. Robins H. Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2013/10/16. 2013 Oct;25(5):646–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24140071>
117. Kirsch I, Vignali M, Robins H. T-cell receptor profiling in cancer. *Mol Oncol*. 2015;9(10):2063–70.
118. Peña C. Subpoblaciones de linfocitos T. *Biomed* [Internet]. 1984;4((3-4)):122–35.
119. EHA. Separación de células. 2017;17. Available from: [https://www.google.com.mx/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=separacion celular eh](https://www.google.com.mx/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=separacion%20celular%20ehu)

120. Houston Thompson R, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is Expressed by Tumor-Infiltrating Immune Cells and Is Associated with Poor Outcome for Patients with Renal Cell Carcinoma. 2007;13(6):1757–62.
121. Martin SD, Wick DA, Nielsen JS, Little N, Holt RA, Nelson BH. A library-based screening method identifies neoantigen-reactive T cells in peripheral blood prior to relapse of ovarian cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017 Sep 21;7(1):e1371895–e1371895. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29296522>
122. Bobisse S, Genolet R, Roberti A, Tanyi JL, Racle J, Stevenson BJ, et al. Sensitive and frequent identification of high avidity neo-epitope specific CD8+T cells in immunotherapy-naive ovarian cancer. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1092. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03301-0>
123. Cafri G, Yossef R, Pasetto A, Deniger DC, Lu Y-C, Parkhurst M, et al. Memory T cells targeting oncogenic mutations detected in peripheral blood of epithelial cancer patients. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Jan 25;10(1):449. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30683863>
124. Inozume T, Hanada K-I, Wang QJ, Ahmadzadeh M, Wunderlich JR, Rosenberg SA, et al. Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. *J Immunother* [Internet]. 2010;33(9):956–64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948441>
125. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* [Internet]. 2014/03/25. 2014 May;124(5):2246–59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667641>
126. Noguchi M, Yao A, Harada M, Nakashima O, Komohara Y, Yamada S, et al. Immunological evaluation of neoadjuvant peptide vaccination before radical prostatectomy for patients with localized prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2007 Jun 15;67(9):933–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440952>
127. Rusak M, Eljaszewicz A, Bołkun Ł, Łuksza E, Łapuć I, Piszcz J, et al. Prognostic significance of PD-1 expression on peripheral blood CD4⁺ T cells in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Pol Arch Med Wewn* [Internet]. 2015/07/03. 2015;125(7–8):553–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140546>

128. Zhang W, Bai J-F, Zuo M-X, Cao X-X, Chen M, Zhang Y, et al. PD-1 expression on the surface of peripheral blood CD4(+) T cell and its association with the prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med* [Internet]. 2016/10/05. 2016 Nov;5(11):3077–84. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709793>
129. Zuo M, Shen H, Yin J, Wang W, Zhang Y, Zhou D-B, et al. Expression of PD-1 on peripheral blood Treg cells is related to the diagnosis, prognosis and treatment of T cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Res* [Internet]. 2018/05/24. 2018 Jul;70:56–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29859415>
130. Zheng W, Xiao H, Liu H, Zhou Y. Expression of programmed death 1 is correlated with progression of osteosarcoma. *APMIS* [Internet]. 2014/09/25. 2015 Feb;123(2):102–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257510>
131. Linnemann C, Mezzadra R, Schumacher TNM. TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev* [Internet]. 2014 Jan;257(1):72–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24329790>
132. Thor Straten P, Schrama D, Andersen MH, Becker JC. T-cell clonotypes in cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2004 Apr 8;2(1):11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15072580>
133. Schrama D, Ritter C, Becker JC. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2017/01/10. 2017 Apr;39(3):255–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074285>
134. Kuehm LM, Wolf K, Zahour J, DiPaolo RJ, Teague RM. Checkpoint blockade immunotherapy enhances the frequency and effector function of murine tumor-infiltrating T cells but does not alter TCR β diversity. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2019/05/18. 2019 Jul;68(7):1095–106. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31104075>
135. Valteau D, Scott V, Carcelain G, Hartmann O, Escudier B, Hercend T, et al. T-cell receptor repertoire in neuroblastoma patients. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Jan 15;56(2):362–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8542593>
136. Levraud JP, Pannetier C, Langlade-Demoyen P, Brichard V, Kourilsky P. Recurrent T cell receptor rearrangements in the cytotoxic T lymphocyte response in vivo against the p815

- murine tumor. *J Exp Med* [Internet]. 1996 Feb 1;183(2):439–49. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627157>
137. Welte K. G-CSF: filgrastim, lenograstim and biosimilars. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2014 Jul 1;14(7):983–93. Available from: <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.905537>
 138. Deotare U, Al-Dawsari G, Couban S, Lipton JH. G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2015/04/27. 2015 Sep;50(9):1150–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25915812>
 139. Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2002 May;9(3):183–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953662>
 140. Akiyama Y, Nonomura C, Kondou R, Miyata H, Ashizawa T, Maeda C, et al. Immunological effects of the anti-programmed death-1 antibody on human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Oncol* [Internet]. 2016/06/29. 2016 Sep;49(3):1099–107. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573705>
 141. Wei B, Wang L, Zhao X, Du C, Guo Y, Sun Z. The upregulation of programmed death 1 on peripheral blood T cells of glioma is correlated with disease progression. *Tumour Biol* [Internet]. 2013/12/28. 2014 Apr;35(4):2923–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375192>
 142. Duhon T, Duhon R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Jul 13;9(1):2724. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30006565>
 143. Kamphorst AO, Ahmed R. Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2013/04/09. 2013 Jun;25(3):381–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23582509>

8. ANEXOS

Establecimiento de un modelo preclínico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes

A.L. Luis¹, M. Espinoza¹, L. Franco², A. González-Murillo², G.J. Melen², J.C. Ollero Fresno¹, L. Madero², M. Ramírez²

¹Cirugía Pediátrica, ²Oncología. Hospital Universitario Infantil Niño Jesús. Madrid.

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar un modelo animal de neuroblastoma (NB) que posibilite estudios relacionados con la inmunidad tumoral.

Material y métodos. Se utilizaron dos tipos de células NB. La línea 36769 procedía del ratón TH-MYC^N en el que la sobreexpresión del gen MYCN está gobernada por el promotor de la tirosina hidroxilasa de rata. La línea 4040 procedía de ratones TH-MYC^N/ALK⁺, que además expresan una mutación activadora del gen ALK.

De cada tipo celular se implantaron 1x10⁶ neuroesferas en ratones 129/SVJ (mismo fondo genético que los donantes, n=8), mediante inyección ortotópica en glándula suprarrenal izquierda por abordaje intraperitoneal, a través de laparotomía transversa supraumbilical. Se realizó seguimiento clínico diario postquirúrgico de los animales hasta su sacrificio a las 4 semanas.

La presencia de tumor se confirmó macroscópicamente. La pieza tumoral se extirpó y se procesó para estudios de inmunidad celular y mediadores moleculares de tolerancia. Se investigó la existencia de metástasis por citometría de flujo en bazo, médula ósea y sangre periférica.

Resultados. 1) En todos los ratones trasplantados se generó NB ortotópico. 2) La pieza tumoral se encontró infiltrada por diversas subpoblaciones inmunes, con inmunofenotipo efector, regulador y supresor, similar a la situación descrita en los NB humanos. Además, los mediadores moleculares del microambiente apuntan a un estado de tolerancia protumoral.

Conclusiones. La implantación ortotópica de neuroesferas NB en ratones singénicos nos ha permitido generar un modelo de NB en el que ha sido posible estudiar la inmunidad tumoral.

PALABRAS CLAVE: Neuroblastoma; Modelo preclínico; Transgénico; Singénico; Inmunoterapia.

Correspondencia: Dra. Ana Lourdes Luis Huertas. Hospital Universitario Niño Jesús. Servicio de Cirugía Pediátrica. Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009 Madrid.
E-mail: analluiscp@gmail.com

Este trabajo ha sido financiado con Fondos Públicos por: el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PII02487; EC11-061, y EC07/90591), y del Gobierno de la Comunidad de Madrid (S-BIO-0204-2006, MesenCAM; P2010/BMD-2420, CellCAM).

Otras financiaciones: Asociación Pablo Ugarte (Lucha Cáncer Infantil) y Asociación NEN (Asociación de padres, familiares y amigos de Niños Enfermos con Neuroblastoma).

Recibido: Mayo 2016

Aceptado: Diciembre 2016

ESTABLISHMENT OF A PRECLINICAL NEUROBLASTOMA MODEL IN IMMUNOCOMPETENT MICE

ABSTRACT

Aim. To develop a NB animal model which makes possible studies related to tumor immunity.

Materials and methods. Two types of NB cells were used. Cell line 36769 was derived from TH-MYC^N mouse in which overexpression of the MYCN gene is governed by rat tyrosine hydroxylase promoter. Cell line 4040 was derived from TH-MYC^N/ALK mice, which in addition express an activating mutation of ALK gene.

For each cell type, 1x10⁶ neurospheres were implanted in 129/SVJ mice (with the same genetic background as donors, n=8), via orthotopic injection in the left suprarenal gland by intraperitoneal approach, through a transverse supraumbilical laparotomy.

Daily postsurgical clinical follow-up of the animals was done until they were sacrificed at four weeks.

The tumor presence was macroscopically confirmed. The tumoral sample was excised and was processed for cellular immunity and molecular tolerance mediator's studies.

The existence of metastasis was investigated by flow cytometry in the spleen, bone marrow and peripheral blood.

Results. 1) Orthotopic Neuroblastoma was generated in all the transplanted mice. 2) The tumors were infiltrated by several immune subpopulations, with effector, regulatory and suppressor immunophenotype. This was similar to the immunophenotype described in human NB. Furthermore, the molecular mediators of the environment point to a state of protumoral tolerance.

Conclusion. The orthotopic implantation of NB neurospheres in syngeneic mice has allowed us to generate a NB model in which it has been possible to study the tumor immunity.

KEY WORDS: Neuroblastoma; Preclinical model; Transgenic; Syngeneic graft; Immunotherapy.

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracranial más frecuente en la población pediátrica. Su tratamiento supone un reto para oncólogos y cirujanos pediátricos ya que, a pesar de los avances en las terapias de quimioterapia, radioterapia y trasplante de médula ósea, no se han conseguido

mejoras en la supervivencia en la última década, siendo su mortalidad aún cercana al 50% en los grupos de alto riesgo^(1,2).

En el intento de mejorar su supervivencia, se hace necesario el desarrollo de modelos preclínicos de NB, que permitan la investigación de aspectos citogenéticos y moleculares, que ayuden a esclarecer su origen, así como al desarrollo de nuevas terapias avanzadas⁽³⁻⁶⁾.

En este trabajo se describe el establecimiento de un modelo murino de trasplante de NB en un animal inmunocompetente. Dicho modelo posibilita estudios relacionados con la inmunidad tumoral, un campo de vital importancia en la investigación y el desarrollo de tratamientos futuros de inmunoterapia y viroterapia oncolítica en dicho tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: se usaron ratones comprados al repositorio del National Cancer Institute (Frederick, Maryland, EEUU), mantenidos en el Animalario del CIEMAT (Registro Número 28079-21 A), cumpliendo con todas las recomendaciones y las leyes españolas y europeas (FELASA: Federación Europea de Asociaciones de Laboratorio de Animales en la Ciencia).

Se trasplantaron células de NB procedentes de dos líneas celulares de ratones con NB, en 8 ratones *wild type* (WT) 129/SJV, del mismo fondo genético que los donantes.

La primera línea celular: 36769 ($n=4$), procedía de ratones con NB: TH-MYCN⁺, en el que la sobreexpresión del gen MYCN está gobernada por el promotor de la tirosina hidroxilasa de rata.

La segunda línea celular: 4040 ($n=4$), se obtuvo de ratones, con NB, TH-MYCN⁺/ALK⁺, que además expresan una mutación activadora del gen ALK.

Ambas líneas fueron cedidas por el Doctor Louis Chesler, del Royal Marsden, Londres.

Las células fueron transducidas con un vector lentiviral EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) con el fin de transformarlas en células fluorescentes que permitiera localizarlas por citometría de flujo en órganos periféricos y poder determinar la existencia o no de metástasis.

Las neuroesferas de NB de cada línea celular se cultivaron en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con B27 sin vitamina A (Gibco), mFGF (*murine Fibroblastic Growth Factor*: 40 ng/ml, R&D Systems), mEGF (*murine Epidermic Growth Factor*: 20 ng/ml, R&D Systems) y 1% penicilina-estreptomina (Gibco). Las células se mantuvieron a niveles de subconfluencia con renovación del medio cada 3-4 días.

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia general mediante inyección subcutánea de ketamina (50 ng/g), utilizando atipamezol (2,5 ng/g) como reversor anestésico postquirúrgico.

De cada tipo celular, se implantaron 1×10^6 neuroesferas en los ratones WT 129/SJV mediante inyección ortotópica en la glándula suprarrenal izquierda, por abordaje intraperitoneal a través de laparotomía transversa supraumbilical. Para el acce-

so a la región retroperitoneal y zona suprarrenal, se exteriorizó la cámara gástrica y asas de intestino delgado, y se desplazó el bazo hacia la línea media. Se utilizaron suturas absorbibles de 7/0 para la ligadura de sangrados capilares puntiformes en el mesenterio o en la pared abdominal. Tras la confirmación de una adecuada hemostasia, se procedió al cierre de la cavidad abdominal por planos, con suturas absorbibles de 6/0 y 5/0. Se realizó una sutura intradérmica con material absorbible de 5/0 para el cierre del plano cutáneo.

Se hizo seguimiento clínico diario postquirúrgico de todos los animales hasta su sacrificio a las 4 semanas de la inyección, realizándose posteriormente la necropsia mediante el mismo abordaje quirúrgico intraabdominal al descrito en el proceso del implante, en todos los casos.

Se valoró la existencia de tumor mediante estudio anatómico macroscópico de la cavidad abdominal.

Se realizó extirpación de la glándula suprarrenal izquierda, y parte de la pieza tumoral se fijó en formaldehído (10%) y se incluyó en parafina, para la posterior tinción con hematoxilina-eosina (HE) para el estudio anatomopatológico microscópico en microscopio de luz.

El resto del tumor se procesó para la detección del infiltrado leucocitario (CD45⁺) y estudio de las subpoblaciones linfocitarias mediante la realización de citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson) y para el estudio de la expresión génica de mediadores moleculares del microambiente tumoral: *CTLA-4* y *PD-1*, mediante qRT-PCR (*"quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction"*).

Por último, se realizó citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson) en bazo, médula ósea y sangre periférica para la investigación de metástasis.

RESULTADOS

En todos los casos ($n=8$) se consiguió el implante celular sobre la glándula suprarrenal izquierda por abordaje intraperitoneal, mediante laparotomía transversa izquierda en 6/8 animales, y ampliada a línea media en los 2/8 casos restantes.

En todos los procedimientos se observó la existencia de un "habón" sobre la glándula suprarrenal durante la inyección, sin objetivarse extravasaciones a cavidad abdominal, por lo que no se requirieron inyecciones adicionales en ningún caso. No se observaron complicaciones hemorrágicas, ni lesiones de órganos vecinos durante los implantes suprarrenales. Los 8 ratones sobrevivieron al trasplante ortotópico de células de neuroblastoma. No se constató ningún caso de hemorragia intraabdominal, como complicación postoperatoria, confirmando un curso postoperatorio favorable en todos los animales, durante las 4 semanas de seguimiento.

En el momento del sacrificio, se confirmó un buen estado clínico de los ratones, y en ningún caso se palpó tumoración abdominal o en el dorso, en la zona lumbar. La herida quirúrgica presentaba buen aspecto, sin signos de infección, y con reabsorción de la sutura en 7/8 casos. En un ratón se observó

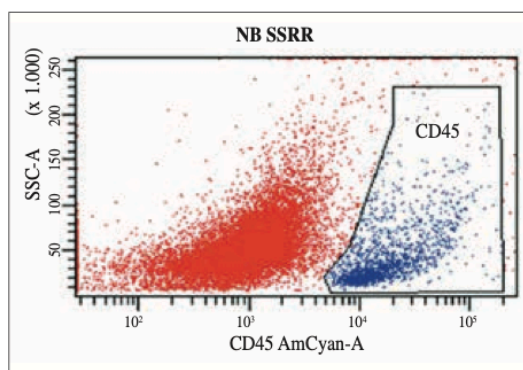


Figura 1. Imagen que muestra la cuantificación de las subpoblaciones inmunitarias CD45, mediante citometría de flujo. Disgregado celular tumoral procedente de tumor suprarrenal izquierdo extraído de un ratón del grupo 4040 TH-MYCN⁺/ALK⁺.

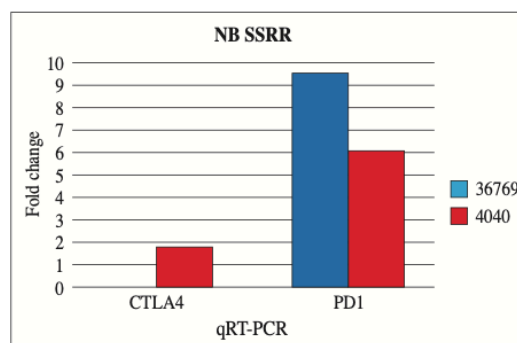


Figura 2. Gráfico en el que se representan los niveles de expresión génica de las moléculas CTLA-4 y PD-1 del microambiente tumoral, mediante cuantificación con qRT-PCR. Se demuestra expresión génica de CTLA-4 en la línea 4040-THMYCN⁺/ALK⁺, y del receptor PD-1 en ambas líneas celulares: 4040-THMYCN⁺/ALK⁺ y 36769-THMYCN⁺.

una pequeña dehiscencia superficial en el margen lateral de la incisión, con un adecuado cierre de los planos profundos de la pared abdominal.

En todos los casos se confirmó macroscópicamente la existencia de tumor en la glándula suprarrenal izquierda, observando masas de mayores dimensiones y más vascularizadas en el grupo en el que se implantó la línea celular 4040; evidenciándose extensión retroperitoneal hasta la línea media en 3 de ellos.

No se evidenciaron lesiones sospechosas de NB en ningún otro órgano abdominal en el estudio anatómico macroscópico.

Los estudios anatomopatológicos microscópicos confirmaron la existencia de neuroblastoma en todas las piezas tumorales extirpadas, consistentes en infiltraciones de neuroblastos en distinto grado de diferenciación neuronal con escaso estroma schwanniano y alto índice de cariorrexis.

La citometría de flujo demostró infiltración leucocitaria tumoral en todos los tumores. La figura 1 muestra un ejemplo de la cuantificación del infiltrado inmune de los tumores.

Se detectó un número ínfimo de células tumorales en médula ósea y sangre periférica en todos los ratones trasplantados, y en bazo, en 2/4 de los animales del grupo 4040-TH-MYCN⁺.

Se detectaron niveles de expresión génica de PD-1 en todos los tumores, y de CTLA-4 en los generados a partir de la línea celular 4040; como muestra la figura 2.

DISCUSIÓN

El NB, uno de los tumores más frecuentes entre la población pediátrica, cuenta aún con una mortalidad inaceptable en los casos metastásicos, a pesar de la aplicación de nuevos protocolos de quimioterapia, radioterapia o trasplante de médula ósea. La constatación de la aparición de “tolerancias” a

estos tratamientos, o la elevada toxicidad de los mismos en muchos casos, crea la necesidad del desarrollo de terapias innovadoras complementarias, con otros mecanismos de acción, muy específicos, que minimicen estos riesgos. En este sentido, los tratamientos de inmunoterapia, basados en la activación de la respuesta inmune antitumoral del paciente, han sido ya probados con éxito en muchos tumores en adultos^(3,4,7).

En búsqueda de estas nuevas terapias oncológicas en el NB, es necesario el desarrollo de modelos experimentales que permitan la investigación de aspectos genéticos, inmunitarios o moleculares, involucrados en la etiopatogenia del tumor, así como el estudio de posibles cambios a estos niveles ante la aplicación de tratamientos en las fases preclínicas del desarrollo de nuevos fármacos de futura aplicación en los pacientes⁽⁷⁻⁹⁾.

En este sentido, se dividen en dos grupos principales los modelos animales de NB utilizados en la actualidad: los modelos genéticos y los modelos de trasplante de células de neuroblastoma.

Dentro del primer grupo, se ha desarrollado ampliamente en los últimos 15 años el modelo TH-MYCN: modelo murino transgénico de NB, que reproduce las características genéticas y clínicas del NB de alto riesgo con amplificación de N-MYC, del humano⁽⁷⁻¹¹⁾. Consiste en la obtención de ratones transgénicos TH-MYCN⁺ en los que la expresión del oncogén n-MYCN está controlada por el promotor del gen de la tirosina hidroxilasa de la rata, con expresión selectiva en las células precursoras neuronales de origen simpaticoadrenal. Son ratones con tumores espontáneos, de localización en los ganglios de la cadena simpática paraespinal o periadrenal, pero con escasa tendencia a la diseminación metastásica. Histológicamente, se corresponden con tumores con escaso estroma schwanniano y alto índice mitótico, características compartidas con los pacientes con NB metastásicos con amplificación de n-MYC, y con los tumores obtenidos en estos animales.



Figura 3. Imagen que muestra necropsia de ratón perteneciente al grupo 4040 TH-MYCN+/ALK+. El asterisco (*) señala el tumor retroperitoneal originado a partir de la implantación suprarrenal izquierda de 1×10^6 neurosféricas de la línea celular 4040 TH-MYCN+/ALK+.

La principal ventaja de este modelo es la generación de tumores de forma espontánea, en un microambiente tisular y tumoral “adecuado” por asentarse en las localizaciones habituales, y lo más importante, en un huésped inmunocompetente, lo que permite la investigación de aspectos inmunitarios en el tumor o su microambiente^(12,13).

Entre las limitaciones más destacadas se encuentran: la escasa localización adrenal, la escasa tendencia metastásica o la baja ratio de generación tumoral, con una penetrancia variable según los fondos genéticos.

En el intento de obviar estas desventajas, han surgido recientemente los modelos de trasplante de líneas celulares de NB, que permiten la generación de tumores en un menor período de tiempo, con mayor número de animales, al no depender de la generación espontánea del tumor. Dentro de este grupo, se han desarrollado distintas opciones en función del origen de la línea celular: células de NB humano, o de origen animal; o según la localización del implante: sobre la glándula adrenal (*trasplante ortotópico*), a nivel subcutáneo (*trasplante ectópico*) o infusión de células tumorales en sangre periférica^(14,15).

De todas estas modalidades, la más ventajosa parece la del trasplante *singénico* (células de la misma especie animal y mismo fondo genético) al aplicarse sobre animales immuno-

competentes. También la modalidad *ortotópica* que, aunque de mayor dificultad técnica, permite la generación de tumores de localización adrenal y, por lo tanto, en un microambiente tumoral y tisular apropiados, tal y como se ha demostrado en distintos estudios en los que se han observado tumores de mayores dimensiones, más vascularizados y con diferentes subpoblaciones leucocitarias a los ectópicos de localización subcutánea^(9,16).

Con este trabajo, hemos podido desarrollar este modelo de trasplante *singénico* de NB (ratones donantes y receptores de mismo fondo genético: 129/SVJ) y *ortotópico* (implante en glándula adrenal), de células procedentes del modelo murino transgénico TH-MYCN. Hemos podido generar así los tumores de mayor interés, en las condiciones más deseables en el contexto experimental: NB con amplificación n-MYC, y por lo tanto los más agresivos, suprarrenales, y asentados en huéspedes inmunocompetentes. Estas condiciones nos han permitido el estudio de la infiltración leucocitaria, de la expresión de moléculas participantes de la respuesta inmune antitumoral, o de la interacción entre el tumor y su microambiente^(9,10,12,15,17).

Se pudieron vencer los aspectos de mayor dificultad, como el cultivo y expansión *in vitro* de neurosféricas de neuroblastoma siguiendo los protocolos seguidos por otros autores en publicaciones recientes, y que fueron exitosos también en nuestro caso, permitiendo el implante de 1×10^6 células tumorales en cada animal, según se describe en los mismos^(18,19).

En cuanto al procedimiento quirúrgico, se han descrito distintos abordajes: retroperitoneal, intraperitoneal o punciones ecoguiadas, según la experiencia de cada grupo. En nuestro caso, se optó por el abordaje intraperitoneal mediante laparotomía transversa, lo que nos permitió una adecuada y segura accesibilidad, con la consecución de implante celular sobre la glándula suprarrenal, sin complicaciones hemorrágicas, ni daño de órganos vecinos, y con una buena recuperación postquirúrgica en todos los animales.

En relación al estudio de las piezas tumorales, se comprobó que las características histológicas correspondían a las de los tumores metastásicos humanos con amplificación n-myc, y a los descritos en el modelo transgénico THMYCN: con una elevada infiltración neuroblástica, escaso estroma y alto índice mitótico^(11,13).

El estudio celular y molecular de los neuroblastomas, se focalizó en la valoración de existencia de poblaciones celulares inmunes (CD45+) mediante citometría de flujo, y en la expresión de moléculas reconocidas como reguladoras del sistema inmune antitumoral (CTLA-4 y PD-1), mediante qRT-PCR, siguiendo el segundo objetivo de nuestro estudio, en relación a la investigación de la inmunidad tumoral^(10,17,20).

Este interés se basó en el hecho de que el conocimiento de la respuesta inmunitaria en el neuroblastoma, mediante el estudio de las poblaciones celulares del sistema inmune que pueblan el tumor, es vital para el desarrollo de tratamientos que potencian esta inmunidad antitumoral “natural”, como la viroterapia oncolítica o la inmunoterapia adoptiva mediante la infusión de TILS (*tumor infiltrating lymphocytes*), y que se

incluyen dentro de las principales líneas actuales de investigación en el tratamiento del neuroblastoma^(3,5,21,22).

Por otro lado, la demostración de la importancia del microambiente tumoral en el estado de esta respuesta inmune, mediante la expresión de moléculas que modulan pasos críticos del ciclo inmune en el cáncer, ha promovido la investigación de tratamientos reguladores de la función de estos mediadores, como CTLA-4 que inhibe la activación (*"priming"*) de los linfocitos T, o el receptor PD-1: que disminuye su respuesta citotóxica en el tumor. Estas terapias denominadas *"check-point inhibitors"*, se incluyen junto a la inmunoterapia, en las denominadas *"targeted therapies"* (*"terapias diana"*), que son objeto primordial de la investigación actual en el tratamiento del neuroblastoma o de otros tumores en niños y adultos^(6,20,23,24).

La necesidad de investigaciones sobre el sistema inmunitario en el NB, como en otros tumores pediátricos, se justifica además, por la peculiaridad de que las mutaciones o cambios epigenéticos que influyen en su etiopatogenia y pronóstico, acontecen en un corto período de tiempo, en muchos casos en la etapa intrauterina y, por lo tanto, en pacientes con un sistema inmune aún *"virgen"*, a diferencia de lo que ocurre en adultos en los que en el origen del cáncer influyen mutaciones ocurridas a lo largo de los años, en el contexto de un sistema inmunitario *"sensibilizado"* con multitud de antígenos. Ante esta situación, es probable que la función inmune o los factores que la regulan, como los que influyen en su interacción con el microambiente del tumor, sean diferentes en los tumores pediátricos con respecto a los de adultos, y justifiquen en cierta medida la distinta respuesta a las diferentes modalidades de inmunoterapia en una u otra población⁽²³⁾.

Es importante señalar también, en relación al interés del estudio del inmunofenotipo tumoral, la influencia de las características del infiltrado inmune tumoral en la respuesta a ciertos tratamientos de inmunoterapia. Así, se ha visto que los tratamientos anti-PD-1 son eficaces solo en aquellos tumores en los que hay una importante infiltración de linfocitos T citotóxicos, demostrándose refractariedad a los mismos en los que existe poca infiltración de esta subpoblación linfocitaria^(6,25).

Uno de los aspectos de discusión en los experimentos publicados sobre trasplante de líneas celulares de NB es precisamente la distinta agresividad tumoral en cuanto al crecimiento local y vascularización; o diferencias en el inmunofenotipo y expresión molecular tumoral y de su microambiente, en función del distinto tipo de línea celular tumoral^(9,14). En cierto modo, hemos podido detectar a nivel anatómico estas diferencias, ya que se evidenciaron neuroblastomas de mayores dimensiones y más vascularizados, en los ratones trasplantados con la línea celular 4040 THMYCN⁺/ALK⁺⁽²⁶⁾.

Como conclusión, y basándonos en nuestros resultados, podemos concluir que la implantación ortotópica de neurosferas de NB en ratones singénicos inmunocompetentes nos ha permitido generar un modelo de NB en el que ha sido posible estudiar la inmunidad tumoral y mediadores moleculares del microambiente que apuntan a un estado de tolerancia protumoral.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Louis Chesler, Royal Marsden NHS Foundation Trust, London.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 289-97.
2. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3286-92.
3. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2202-11.
4. Moreno L, Chesler L, Hargrave D, Eccles SA, Pearson AD. Pre-clinical drug development for childhood cancer. *Expert Opin Drug Discov*. 2011; 6: 49-64.
5. Ramirez M, Garcia-Castro J, Alemany R. Oncolytic virotherapy for neuroblastoma. *Discov Med*. 2010; 10: 387-93.
6. Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *Br J Haematol*. 2013; 162: 313-25.
7. Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov*. 2015; 10: 53-62.
8. Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models—contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 245-55.
9. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One*. 2011; 6: e19133.
10. Cheng AJ, Cheng NC, Ford J, Smith J, Murray JE, Flemming C, et al. Cell lines from MYCN transgenic murine tumours reflect the molecular and biological characteristics of human neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1467-75.
11. Moore HC, Wood KM, Jackson MS, Lastowska MA, Hall D, Imrie H, et al. Histological profile of tumours from MYCN transgenic mice. *J Clin Pathol*. 2008; 61: 1098-103.
12. Robinson M, Li B, Ge Y, Ko D, Yendluri S, Harding T, et al. Novel immunocompetent murine tumor model for evaluation of conditionally replication-competent (oncolytic) murine adenoviral vectors. *J Virol*. 2009; 83: 3450-62.
13. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J*. 1997; 16: 2985-95.
14. Daudigeos-Dubus E, L LED, Rouffiac V, Bawa O, Leguener I, Opolon P, et al. Establishment and characterization of new orthotopic and metastatic neuroblastoma models. *In Vivo*. 2014; 28: 425-34.
15. Khanna C, Jaboin JJ, Drakos E, Tsokos M, Thiele CJ. Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis. *In Vivo*. 2002; 16: 77-85.

16. Kroesen M, Brok IC, Reijnen D, van Hout-Kuijer MA, Zeelenberg IS, Den Brok MH, et al. Intra-adrenal murine TH-MYCN neuroblastoma tumors grow more aggressive and exhibit a distinct tumor microenvironment relative to their subcutaneous equivalents. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64: 563-72.
17. Pistoia V, Morandi F, Bianchi G, Pezzolo A, Prigione I, Raffaghello L. Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. *Front Oncol.* 2013; 3: 167.
18. Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, et al. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One.* 2014; 9: e86813.
19. Liu QX, Tang JY, Cai JY, Yin MZ, Li BS. The cultivation and identification of tumor stem cells from neuroblastoma derived tumor spheres. *Chin J Cancer.* 2010; 29: 1012-7.
20. Carlson LM, De Geer A, Sveinbjornsson B, Orrego A, Martinsson T, Kogner P, et al. The microenvironment of human neuroblastoma supports the activation of tumor-associated T lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e23618.
21. Melen GJ, Franco-Luzon L, Ruano D, Gonzalez-Murillo A, Alfranca A, Casco F, et al. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett.* 2016; 371: 161-70.
22. Pesonen S, Kangasniemi L, Hemminki A. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol Pharm.* 2011; 8: 12-28.
23. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013; 39: 1-10.
24. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2015; 669-82.
25. Kodumudi KN, Siegel J, Weber AM, Scott E, Sarnaik AA, Pilon-Thomas S. Immune Checkpoint Blockade to Improve Tumor Infiltrating Lymphocytes for Adoptive Cell Therapy. *PLoS One.* 2016; 11: e0153053.
26. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell.* 2012; 22: 117-30.



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA PEDIÁTRICA

Estimado colega:

El Consejo de Redacción de CIRUGIA PEDIÁTRICA ha examinado detenidamente su trabajo titulado:

LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR EN SANGRE PERIFÉRICA EN UN MODELO DE NEUROBLASTOMA.

Autores:

Drs. Manuel Leónidas Espinoza Vega; Ana Lourdes Luis Huertas; África González Murillo; Lidia Franco-Luzón; Manuel Ramírez Orellana.

Nos complace comunicarle que **HA SIDO ACEPTADO** para su publicación en Cirugía Pediátrica en el nº2 (Abril) de este año en curso. Recibirá las correspondientes pruebas de imprenta para su corrección.

Le recordamos que Cirugía Pediátrica es una publicación indexada en Index Médico, Índice médico español y Pubmed con ISSN: 2445-2807 y su versión inglesa con ISSN: 2695-6942.

Gracias por confiar a la revista de Cirugía Pediátrica la difusión de su conocimiento y experiencia.

Saludos cordiales

Dra. Carmen Soto Beauregard
Editora Jefe de Cirugía Pediátrica

IIIc. Trabajo completo

Linfocitos infiltrantes de tumor en sangre periférica en un modelo de neuroblastoma

M. Espinoza Vega, A. L. Luis Huertas, A. González Murillo, L. Franco-Luzón, M. Ramírez Orellana

Hospital Infantil Universitario Niño Jesús

Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009, Madrid (España).

Financiación: Instituto de Salud Carlos III, referencias PI13/02487 y PI16/02008. MRO

Recibe fondos de Asociación Pablo Ugarte, Asociación NEN y Fundación Neuroblastoma.

Correspondencia: Manuel Ramírez Orellana. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009, Madrid.

Teléfono: 91 503 59 38

e-mail: manuel.ramirez@salud.madrid.org

Fecha de envío: 19 de diciembre 2019

Recuento de palabras: 2460.

RESUMEN

OBJETIVO

Comprobar la existencia de linfocitos T que incluyen linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en la sangre periférica (SP) de un modelo preclínico de neuroblastoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Utilizamos un modelo en ratones inmunodeficientes y otro en inmunocompetentes mediante inyección de suspensiones de la línea tumoral NB36769 con mutación de MYCN (TH-MYCN⁺). Se realizaron análisis por citometría de flujo (bazo, SP y tumor) y secuenciación del TCR- β en el ADN de muestras pareadas de tumor y SP.

RESULTADOS

En los ratones inmunodeficientes el componente principal en SP fue CD4: 83,1% (control) y 86,1% (tumor) siendo PD-1⁺ el 0,4% y el 0,3%. En el bazo, obtuvimos un mayor porcentaje de linfocitos T PD-1⁺ que en SP siendo similar en el control (6,5%) y en el ratón con tumor (6,2%), en subpoblación CD4⁺ exclusivamente. En los ratones inmunocompetentes observamos que la proporción de los 10 clones más frecuentes en los tumores constituía el 11,09% \pm 2,83% del repertorio del TCR mientras en SP representaba el 1,59% \pm 0,59% ($p=0,024$). Estos resultados sugieren un enriquecimiento de clonotipos dentro del tumor. De los 10 clones más frecuentes en las muestras tumorales, localizamos 9 también en la SP en dos ratones y 6 en el tercero. Además, encontramos secuencias compartidas por TILs de animales diferentes.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados de inmunofenotipo y clonalidad apuntan a la existencia de linfocitos en SP que podrían contener TILs en un modelo experimental de neuroblastoma.

PALABRAS CLAVE

Neuroblastoma; inmunoterapia; linfocitos infiltrantes de tumor.

ABSTRACT

Tumor-infiltrating lymphocytes in the peripheral blood of a neuroblastoma model

AIM

To detect tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the peripheral blood of a preclinical neuroblastoma model.

MATERIAL AND METHODS

Two types of preclinical models were generated: immunodeficient mice and immunocompetent mice by injection of a cell suspension of neuroblastoma cell line NB36769 with overexpression of the MYCN gene (TH-MYCN⁺). Spleen, tumor and peripheral blood was investigated by flow cytometry to detect PD-1⁺ T-cells. TCR- β immunosequencing was performed in matched samples (tumor and peripheral blood).

RESULTS

The majority of peripheral blood T-cells of immunodeficient mice were CD4 (control: 83,1%; tumor: 86,1%) with a small proportion of PD-1⁺ (control: 0,4%; tumor: 0,3%). However, the percentage of T-cells PD-1⁺ in the spleen was higher (control: 6,5%; tumor: 6,2%) and it was expressed exclusively on the CD4⁺ subset.

Regarding TCR profile of immunocompetent mice, the proportion of the 10 most frequent sequences was significantly higher in tumors ($11,09\% \pm 2,83\%$) than in peripheral blood ($1,59\% \pm 0,59\%$) ($p=0,024$). These findings suggest an enrichment of clonotypes inside the tumor. Nine out of the 10 most frequent clones of tumors were identified in the matched peripheral blood sample in two mice and 6/10 in one mouse. Moreover, we found TILs with shared sequences between different animals.

CONCLUSIONS

Our results of immunophenotype and clonality suggest the existence of peripheral blood T-cells which could include TILs in a preclinical neuroblastoma model.

KEY WORDS

Neuroblastoma; immunotherapy; tumor-infiltrating lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la edad pediátrica con una incidencia anual de 1,1 cada 100000 niños de entre 0 y 14 años, constituyendo hasta el 7% de todos los tumores malignos en menores de 15 años⁽¹⁾. A pesar de los avances en el tratamiento de esta patología durante los últimos años, las tasas generales de supervivencia en los pacientes con tumores de alto riesgo son menores del 40%, incluso con la utilización de terapia intensiva multimodal^(2,3). En la actualidad, el neuroblastoma supone hasta el 15% de todas las muertes por cáncer en la edad pediátrica⁽⁴⁾.

La aparición de estrategias de inmunoterapia como la terapia celular adoptiva (TCA) para el tratamiento de tumores sólidos se presenta como una nueva opción terapéutica para mejorar los resultados de esta población. Aunque existen numerosos ensayos clínicos en tumores típicos de adultos como el melanoma, son pocas las vías que han explorado su potencial terapéutico en tumores infantiles⁽⁵⁾.

Los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) constituyen una población heterogénea de células T $\alpha\beta$. La presencia de infiltrado de estas células linfoides en los tumores se ha asociado a un pronóstico más favorable en pacientes con neuroblastoma⁽⁶⁾. El grupo del Dr. Rosenberg ha demostrado que las células T PD1+ de la sangre periférica (SP) de pacientes con melanoma contienen linfocitos T antitumorales, sugiriendo que se trata de una subpoblación circulante de TILs⁽⁷⁻⁹⁾, con un inmunofenotipo que se caracteriza por ser CD3+, con subpoblaciones de CD4+ y CD8+ que expresan además PD-1, por lo que pueden ser reconocidas mediante citometría de flujo.

En el caso del neuroblastoma, un tumor retroperitoneal de difícil acceso, la obtención de muestras tisulares requiere de procedimientos invasivos. La posibilidad de que estas células circulen en SP podría evitar estas intervenciones y disminuir la morbilidad a la que están sometidos estos pacientes.

En este trabajo, desarrollamos un modelo murino con la finalidad de comprobar la existencia de linfocitos PD-1+ circulantes en la SP que podrían servir como fuente de dichas células para su utilización en el desarrollo de TCA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) inmunodeficientes *NOD scid gamma*, que carecen de linfocitos B y T, y *wild type* (WT) de la sublínea 129/SvJ para el modelo inmunocompetente. Dichos animales se compraron al repositorio del National Cancer Institute (Frederick, Maryland, EE.UU.). Su cría y mantenimiento se llevo a cabo en el Servicio del Animalario del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) con registro 28079-21 A.

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el OEBA (órgano para evaluar el bienestar animal) en CIEMAT y el Departamento Regional de Madrid de Medio ambiente, con referencia PROEX 186/15.

Células: Se seleccionó la línea celular de neuroblastoma 36769 (NB36769) con una amplificación del oncogén MYCN por el promotor de la tirosina hidroxilasa de rata (TH-MYCN+) proveniente de ratones 129/SvJ⁽¹⁰⁾. Dicha línea fue cedida por el Profesor Louis Chesler (The Royal Marsden Hospital, Londres). Las células tumorales, también denominadas neuroesferas, se cultivaron en suspensión con medio DMEM:F12 (1:1) (Gibco™), suplementado con 1xB27 sin vitamina A (Gibco™), mFGF 40 ng/ml (R&D Systems®), mEGF 20 ng/ml (R&D Systems®) y penicilina-estreptomicina 1% (Gibco®) en estufa a 37 °C y 5% CO₂ y se mantuvieron a niveles de subconfluencia con renovación del medio cada 3-4 días.

Modelo de neuroblastoma en animales inmunodeficientes: se inyectaron suspensiones de 1×10^6 neuroesferas en 50 μ l de medio no suplementado en el tejido celular subcutáneo de la región dorsal derecha utilizando agujas de 25 G x 5/8". Al octavo día postinyección, se inocularon en la misma región suspensiones con 1×10^5 TILs obtenidos de neuroblastomas generados mediante el modelo de trasplante ortotópico en ratones 129/SvJ inmunocompetentes con la misma línea (NB36769).

Modelo de neuroblastoma en animal inmunocompetente: se implantaron suspensiones de 4×10^5 neuroesferas en 30 μ l de medio no suplementado mediante inyección ortotópica en la glándula suprarrenal izquierda según describió nuestro grupo⁽¹¹⁾.

El sacrificio se realizó a las 4 semanas del implante. Se obtuvieron muestras de SP por exanguinación y tumorales mediante exéresis.

Las muestras de SP se conservaron con 50 μ l de EDTA 0,5 M, a temperatura ambiente. Se utilizó solución lisante de hematíes (Quiclysis™, Cytognos) a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 10 minutos. Las células fueron lavadas con PBS pH 7,2 (Gibco™) dos veces.

Los bazos fueron procesados mediante disgregación mecánica sobre un filtro de 40 μ m en tubos cónicos con 30 ml de PBS para la suspensión celular.

Los tumores fueron procesados mediante disgregación mecánica y digestión enzimática con medio RPMI-1640 (Gibco™) suplementado con collagenasa D 1 mg/ml (Roche) y DNAasa 2500 U (Pulmozyme®, Roche), a 37 °C, durante 45 minutos. La digestión enzimática fue inactivada con FBS y las suspensiones celulares filtradas a través de un filtro de 40 μ m. El pellet resultante se lavó dos veces y se resuspendió en 30 ml de PBS.

Se congelaron alícuotas de suspensiones celulares en seco para el aislamiento de ADN y el resto se resuspendió en PBS para su estudio por citometría de flujo (FACSCanto™ II, Becton Dickinson).

Citometría de flujo: Se incubaron 1×10^5 células de las muestras procesadas con los anticuerpos monoclonales CD45.2, CD3, CD4, CD8, PD1 y 7-AAD (Biolegend®) en 100 μ l de PBS, durante 20 minutos a 4 °C, en oscuridad.

Clonalidad: Se purificó el ADN de suspensiones unicelulares congeladas de tumor de 6 ratones 129/SvJ trasplantados y de muestras pareadas de SP de 3 de ellos con el kit QIAamp DNeasy para sangre y tejidos (Qiagen N.V.)⁽¹²⁾. La inmunosecuenciación de la

región TCR- β se realizó por Adaptive Biotechnologies Corp. (Seattle, WA, USA) en el ADN purificado y los datos fueron analizados utilizando el Analizador immunoSEQ®. Los resultados se expresaron como el % del total de patrones de células T originadas por las 10 secuencias más frecuentes⁽¹³⁾.

RESULTADOS

Modelo murino inmunodeficiente

Los ratones *NOD scid gamma* carecen de linfocitos T por lo que son un modelo en el que estudiar el comportamiento de linfocitos T exógenos. En nuestro caso, la única fuente de linfocitos T fueron TILs previamente obtenidos de neuroblastomas desarrollados en ratones inmunocompetentes (ver Metodología). El ratón control presentó un mayor número total de linfocitos T en SP que el ratón con tumor (41175 células/ml, 2,7% y 20000 células/ml, 3,2%, respectivamente). Al analizar el infiltrado linfocitario del bazo, observamos que el porcentaje de linfocitos T fue similar en ambos ratones (control: 44804375 células/ml, 20,9%; y tumor: 44446500 células/ml, 20,4%) (figura 1).

El componente principal de las subpoblaciones de linfocitos T en SP estaba formado por CD4: 83,1% para el ratón control y 86,1% para el ratón con tumor siendo PD-1⁺ el 0,4% y el 0,3%, respectivamente. No se identificaron linfocitos CD8⁺ en el control y en el ratón con tumor el porcentaje fue mínimo (0,1%), sin observar linfocitos CD8⁺PD-1⁺. En el bazo, obtuvimos un mayor porcentaje de linfocitos T PD-1⁺ que en SP. Este porcentaje fue similar en el ratón control (6,5%) que en el ratón con tumor (6,2%). En ambos la subpoblación T PD-1⁺ estaba compuesta por CD4⁺, sin identificarse linfocitos CD8⁺PD1⁺ (figura 2).

Modelo murino inmunocompetente

En primer lugar, comprobamos por citometría de flujo en el modelo inmunocompetente una distribución similar de linfocitos T en SP con predominio de linfocitos CD4⁺PD1⁺. Además, evaluamos el repertorio del TCR de TILs y SP para comprobar la existencia de linfocitos T clonales en ambas localizaciones anatómicas. Analizamos 6 ratones con neuroblastomas mediante secuenciación masiva de la región CDR3 del TCR-β. En tres de ellos sólo se analizaron los tumores.

Cuando analizamos los niveles de linfocitos T en SP mediante CD3 obtuvimos 1175667 ± 773224 células/ml ($32,23 \pm 7,48\%$), mientras que los niveles de linfocitos T en el tumor, fueron de 261500 ± 71409 células/ml ($0,1 \pm 1,7E-17\%$) (figura 3).

Inicialmente, analizamos los 10 clones más frecuentes en las muestras pareadas (tumor-SP) de 3 ratones, observando que en los tumores esta proporción constituía el $11,09\% \pm 2,83\%$ del repertorio del TCR mientras que en SP representaba el $1,59\% \pm 0,59\%$ ($p=0,024$). Estos resultados sugieren un enriquecimiento de clonotipos dentro del tumor.

Cuando investigamos la distribución clonal de las células T en los tumores de los 6 ratones, no encontramos secuencias comunes para todos. Sin embargo, existen dos secuencias compartidas por tres de los ratones y cinco por dos, representando el $7,64\%$ del repertorio de TCR en todas las muestras. Estas secuencias podrían corresponder con clones específicos de tumor contra neuroblastoma (Tabla I).

Por último, el análisis de las muestras pareadas mostró un promedio de 132 ± 79 secuencias compartidas de un total de 242 ± 68 secuencias en los tumores y 60306 ± 25765 secuencias en la SP. De los 10 clones más frecuentes encontrados en las muestras tumorales, 9 se encontraron también en la SP en dos de los ratones y 6 en el tercer ratón (figura 5).

DISCUSIÓN

Actualmente, los TILs han demostrado ser una herramienta terapéutica útil en el tratamiento de tumores como el melanoma⁽¹⁴⁾, donde un estudio reciente ha demostrado la posibilidad de reconocer una respuesta inmune antitumoral específica de cada paciente mediante la identificación de células T PD1⁺ en SP⁽⁷⁾. Por el contrario, en el caso de los tumores infantiles, la caracterización fenotípica y funcional de estas poblaciones inmunes está escasamente descrita en la literatura y la existencia de TILs PD1⁺ circulantes en SP no ha sido analizada previamente en el neuroblastoma^(7,15–19). La existencia de TILs circulantes en la SP de estos pacientes abriría la posibilidad de evitar procedimientos quirúrgicos para obtener el material de inicio para la fabricación de TCA^(7,15–20).

En este trabajo hemos estudiado la posibilidad de que individuos con neuroblastoma presenten TILs circulantes en SP. Para ello, hemos simulado la situación en un modelo murino. Para identificar estas células, hemos utilizado un criterio inmunofenotípico como es la expresión de PD-1 en linfocitos T circulantes. El grupo del Dr. Rosenberg demostró que en el melanoma las células T PD-1⁺ en SP contienen linfocitos T antitumorales, sugiriendo que se trata de una subpoblación circulante de TILs^(7–9). En un primer experimento, comprobamos la existencia de circulación de estas células en ratones inmunodeficientes, siendo el componente en SP CD4⁺PD1⁺, sin que se observaran prácticamente linfocitos CD8⁺PD1⁺. Posteriormente, confirmamos la existencia de estas células en ratones inmunocompetentes portadores de neuroblastoma generado mediante la inyección de la línea celular NB36769, comprobando por citometría de flujo una distribución similar en SP con el predominio de linfocitos CD4⁺PD1⁺. Este es el primer trabajo que analiza la existencia de estas células en SP de un modelo experimental de neuroblastoma. En los escasos ejemplos existentes en la literatura, destaca el trabajo llevado a cabo por Waki K y cols. en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) que mostró también un componente mayoritario en SP de linfocitos T

CD4⁺PD1⁺ con un fenotipo efector-memoria (CD45RA⁺CCR7⁻). Por otra parte, estudios realizados en melanoma han confirmado la existencia de un infiltrado mayoritario de TILs CD8⁺PD1⁺ en los tumores, siendo minoritarios en SP ^(17,21). Estos datos se correlacionan con los resultados obtenidos en nuestros experimentos en los que la subpoblación CD4⁺PD1⁺ siempre excedió a la de CD8⁺PD1⁺, tanto en modelo inmunodeficiente con tumor implantado (la única fuente posible de linfocitos T circulantes fueron los TILs) como en el modelo inmunocompetente portador de neuroblastoma.

El otro criterio que hemos utilizado para identificar la presencia de TILs circulantes es la similitud de secuencias génicas (y de aminoácidos) en la región 3 hipervariable determinante de la complementariedad (CDR3) del TCR-β^(13,22-29) mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (SNG)^(22,24) que posibilitan detectar y rastrear células T específicas⁽²⁵⁾. En el caso del neuroblastoma, no existen muchas publicaciones que hayan analizado el repertorio del TCR de los TILs. En un estudio en el que se analizó la región CDR3 de los TILs de 6 pacientes con neuroblastomas, la mitad de ellos presentó una marcada expansión clonal de linfocitos T no observada en la sangre, aunque este trabajo se realizó con técnicas de secuenciación antiguas⁽²⁸⁾. Nosotros hemos encontrado también una situación de oligoclonalidad en los TILs respecto a la SP. En el análisis de los 10 clones más frecuentes de los tumores, encontramos un enriquecimiento de clonotipos. Por otra parte, acorde a la literatura, no hemos encontrado secuencias compartidas por todos los tumores analizados. Sin embargo, existen dos secuencias compartidas por tres de los tumores y cinco por dos. La existencia de secuencias clono específicas similares en los linfocitos T de diferentes animales que comparten los antígenos del MHC sugiere que dichas subpoblaciones de linfocitos T se han expandido frente a un antígeno que comparten los diferentes individuos y es presentado por las moléculas del MHC. Por tanto, podrían corresponder con clones específicos de tumor contra el neuroblastoma. La relevancia de nuestros

resultados en relación a estos hallazgos consiste en la demostración *in vivo* de la posible existencia de una respuesta frente a antígenos comunes expresados por el neuroblastoma y que podrían ser de utilidad para el rastreo de las células T responsables de esta respuesta, además de para su reconocimiento y utilización como TCA. El análisis del repertorio de TCR intratumoral de pacientes con neuroblastoma mediante técnicas de SNG podría permitir un mejor entendimiento de la diversidad del infiltrado tumoral por TILs, su grado de reactividad y su antígeno-especificidad.

El grupo del Dr. Rosenberg ha demostrado recientemente la posibilidad de identificar una respuesta inmune antitumoral específica de cada paciente mediante la identificación de células T PD1⁺ en SP⁽⁷⁾. Nuestros resultados por citometría de flujo corroboran la presencia de subpoblaciones que pueden contener linfocitos T antitumorales (PD1⁺) en la SP de los ratones portadores de neuroblastoma. Además, mediante la inmunosecuenciación del infiltrado tumoral, de manera similar al trabajo realizado por Gros y cols., hemos podido comprobar la existencia de clonotipos compartidos entre las muestras pareadas de tumor y SP, lo que refuerza la hipótesis de la circulación por el organismo de las células T implicadas en la respuesta inmune antitumoral también en el caso del neuroblastoma.

Existen en nuestro trabajo una serie de limitaciones. En primer lugar, aunque los modelos murinos de cáncer se han utilizado durante décadas para el estudio de la respuesta inmune antitumoral y el desarrollo de estrategias de inmunoterapia en experimentos preclínicos, los datos disponibles respecto al repertorio de TCR son escasos, lo que dificulta su comparación⁽²⁵⁾. En relación a la caracterización inmunofenotípica, no hemos analizado la expresión de CD39 o CD103, marcadores que en co-expresión identifican TILs CD8 con capacidad antitumoral en diferentes tumores humanos⁽³⁰⁾. Por último, se ha realizado un limitado número de casos experimentales debido al importante coste de los análisis realizados lo que se refleja en la disminución de la potencia estadística para demostrar resultados. Sin embargo, la observación de

las tendencias en nuestros experimentos nos alienta a continuar con esta línea de investigación dados los beneficios potenciales que podrían significar para los pacientes pediátricos con neuroblastoma u otros tumores sólidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Jesús Martínez y Edilia Almeida de CIEMAT para el cuidado de animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2018. 2018;68(1):7–30.
2. Matthay K, Villablanca J, Seeger R. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bon marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med. 1999;341:1165–73.
3. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-kogan D, et al. Long-Term Results for Children With High-Risk Neuroblastoma Treated on a Randomized Trial of Myeloablative Therapy Followed by 13- cis -Retinoic Acid : A Children ' s Oncology Group Study. 2009;27(7):1007–13.
4. National cancer institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Database.
5. Tesfaye M, Savoldo B. Adoptive Cell Therapy in Treating Pediatric Solid Tumors. Curr Oncol Rep. 2018;20(9):73.
6. Gambini C, Conte M, Bernini G, Angelini P, Pession A, Paolucci P, et al. Neuroblastic tumors associated with opsoclonus-myooclonus syndrome: histological, immunohistochemical and molecular features of 15 Italian cases. Virchows Arch. 2003;442(6):555–62.
7. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, Pasetto A, Robbins PF, Ilyas S, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. Nat Med. 2016;22(4):433–8.
8. Schumacher TN, Scheper W. A liquid biopsy for cancer immunotherapy. Nat Med. 2016;22(4):340–1.
9. Hutchinson L. Immunotherapy: Antitumour T cells as peripheral biomarkers. Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(4):203.
10. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical

- models for Neuroblastoma: Establishing a baseline for treatment. PLoS One. 2011;6(4).
11. Luis AL, Espinoza M, Franco L, González-Murillo A, Melen GJ, Ollero Fresno JC, et al. Establecimiento de un modelo preclínico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes. Cir Pediatr. 2016;29(2):66–71.
12. Qiagen. DNeasy ® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue. DNeasy ® Blood Tissue Handb Purif Total DNA from Anim blood Anim tissue. 2006;(July):1–59. Available from: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissu esystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t0>
13. Kirsch I, Vignali M, Robins H. T-cell receptor profiling in cancer. Mol Oncol. 2015;9(10):2063–70.
14. Feldman SA, Assadipour Y, Kriley I, Goff SL, Rosenberg SA. Adoptive Cell Therapy—Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors. Semin Oncol. 2015;42(4):626–39.
15. Malaspina TS de S, Gasparoto TH, Costa MRSN, de Melo Jr EF, Ikoma MRV, Damante JH, et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother. 2011;60(7):965–74.
16. Baruah P, Lee M, Odutoye T, Williamson P, Hyde N, Kaski JC, et al. Decreased levels of alternative co-stimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterise T cells from head and neck cancer patients. Immunobiology. 2012;217(7):669–75.
17. Krönig H, Julia Falchner K, Odendahl M, Brackertz B, Conrad H, Muck D, et al. PD-1 expression on Melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease. Int J cancer. 2012;130(10):2327–36.

18. Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, Terazaki Y, Sakamoto S, Matsueda S, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2014;105(10):1229–35.
19. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016;7(35):56233–40.
20. Choi BK, Kim S, Kim YH, Kwon BS. Cancer immunotherapy using tumor antigen-reactive T cells. *Immunotherapy.* 2018;10(3):235–45.
21. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009;114(8):1537–44.
22. Robins H. Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(5):646–52.
23. Sensi M, Parmiani G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol Today.* 1995;16(12):588–95.
24. Linnemann C, Mezzadra R, Schumacher TNM. TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev.* 2014;257(1):72–82.
25. Thor Straten P, Schrama D, Andersen MH, Becker JC. T-cell clonotypes in cancer. *J Transl Med.* 2004;2(1):11.
26. Schrama D, Ritter C, Becker JC. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Semin Immunopathol.* 2017;39(3):255–68.
27. Kuehm LM, Wolf K, Zahour J, DiPaolo RJ, Teague RM. Checkpoint blockade

- immunotherapy enhances the frequency and effector function of murine tumor-infiltrating T cells but does not alter TCR β diversity. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(7):1095–106.
28. Valteau D, Scott V, Carcelain G, Hartmann O, Escudier B, Hercend T, et al. T-cell receptor repertoire in neuroblastoma patients. *Cancer Res.* 1996;56(2):362–9.
29. Levraud JP, Pannetier C, Langlade-Demoyen P, Brichard V, Kourilsky P. Recurrent T cell receptor rearrangements in the cytotoxic T lymphocyte response in vivo against the p815 murine tumor. *J Exp Med.* 1996;183(2):439–49.
30. Duhén T, Duhén R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun.* 2018;9(1):2724.

TABLAS

Tabla I. Secuencias compartidas por las muestras tumorales.

Amino Acid	Sum (Productive Frequency)	Present In
CASSQDRGSYEQYF	0,614106	3
CASSPGQGAGEQYF	3	3
CASSQNQAPLF	0,195684	2
CASSQGQSSYEQYF	0,834896	2
CASSQDWGDEQYF	0,356441	2
CASSPRTGDYAEQFF	1	2
CASGDLGGSATLYF	2	2

Secuencias compartidas por las muestras tumorales que podrían constituir clonotipos específicos de TILs contra el neuroblastoma.

FIGURAS

Figura 1.

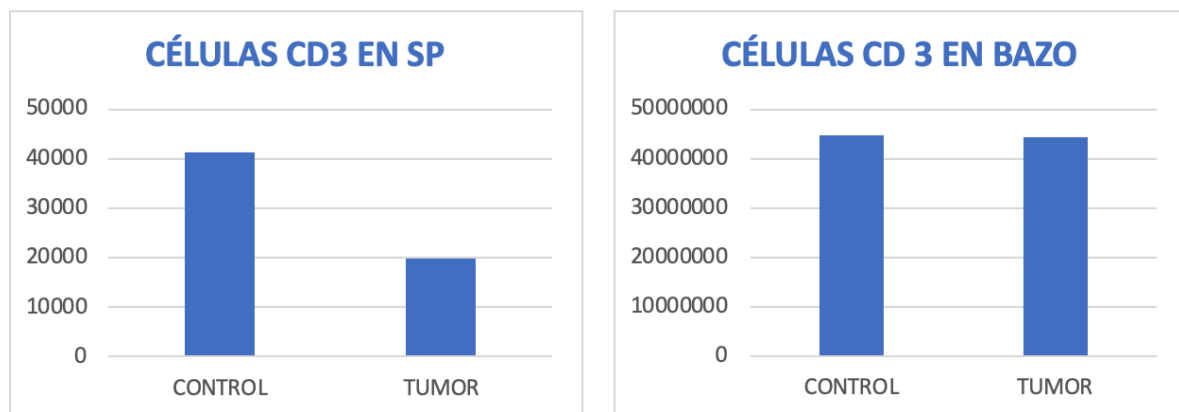


Figura 2.

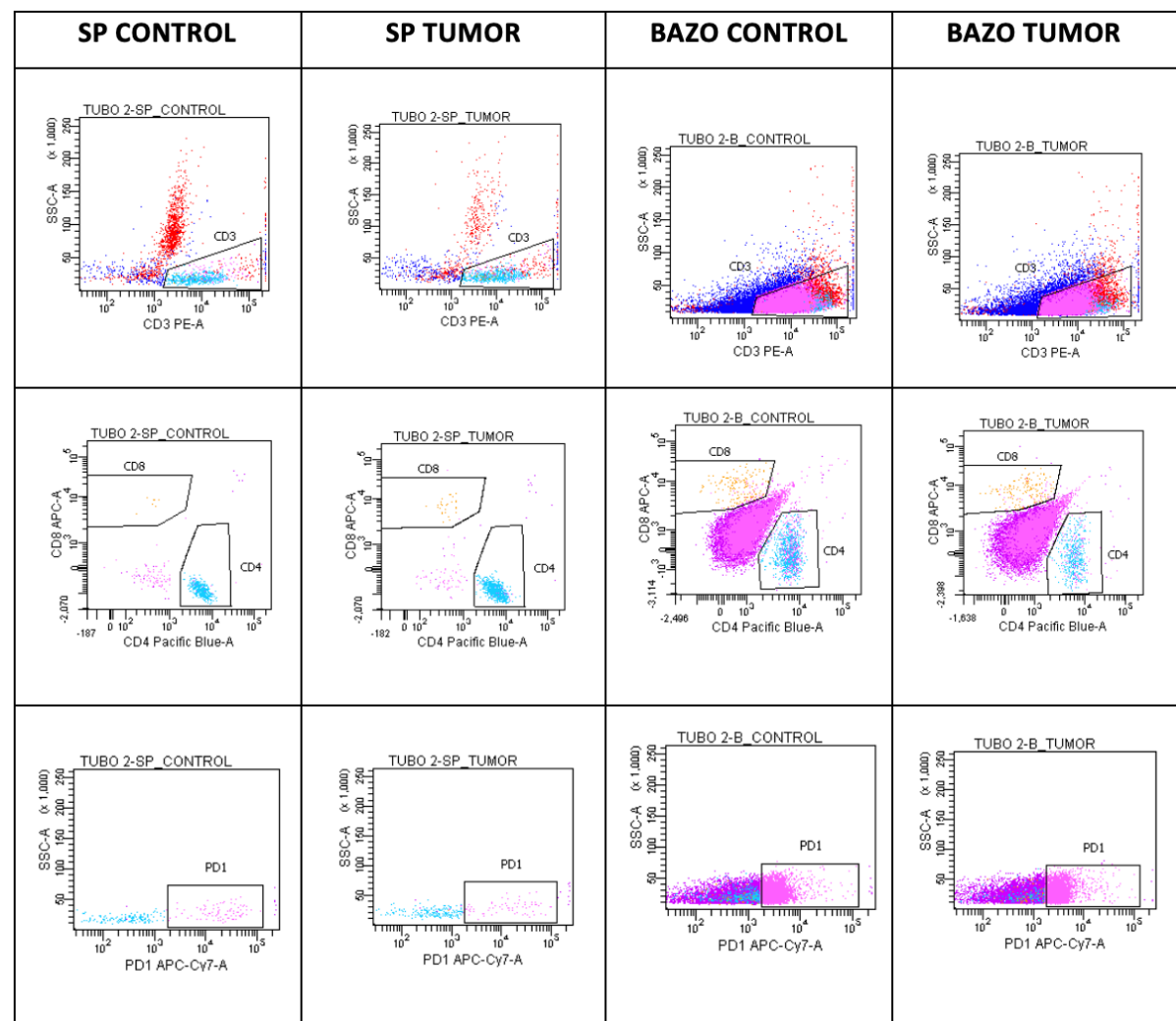


Figura 3.

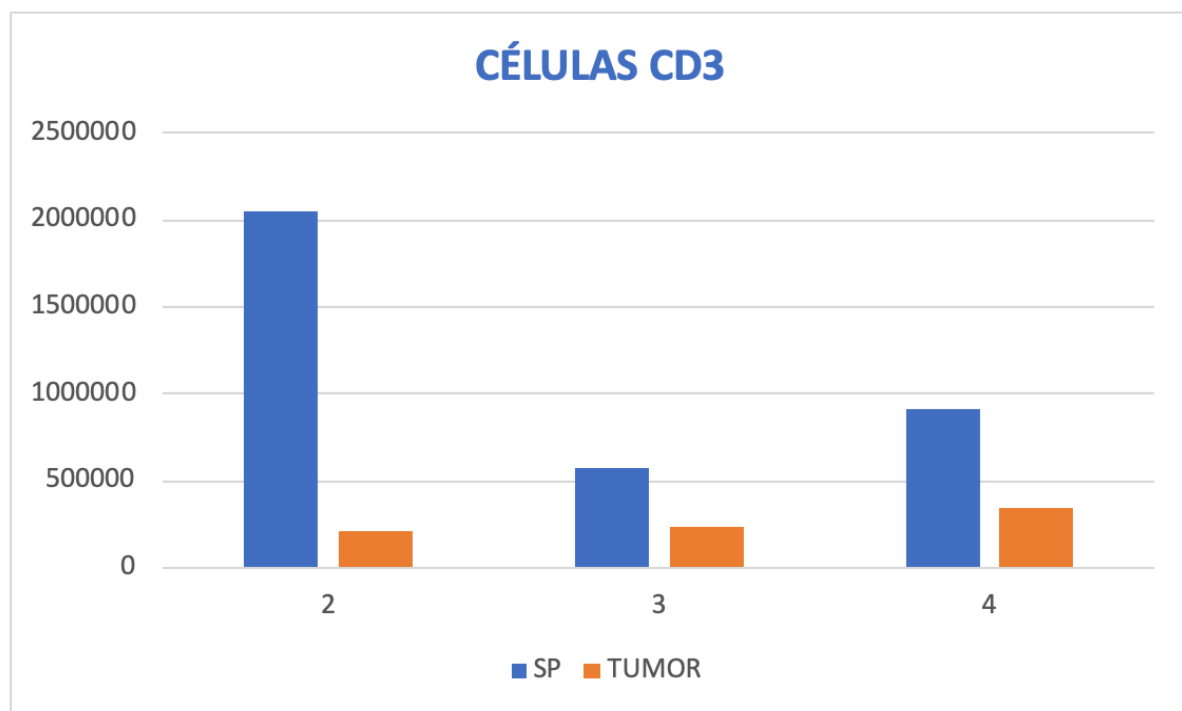


Figura 4.

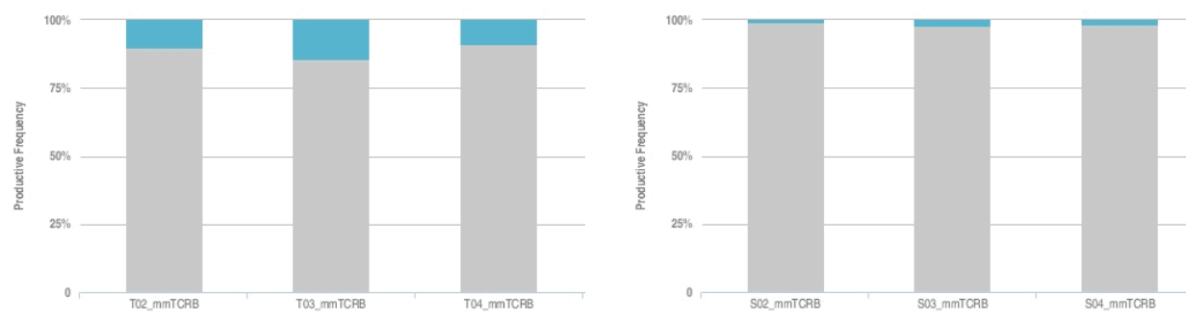
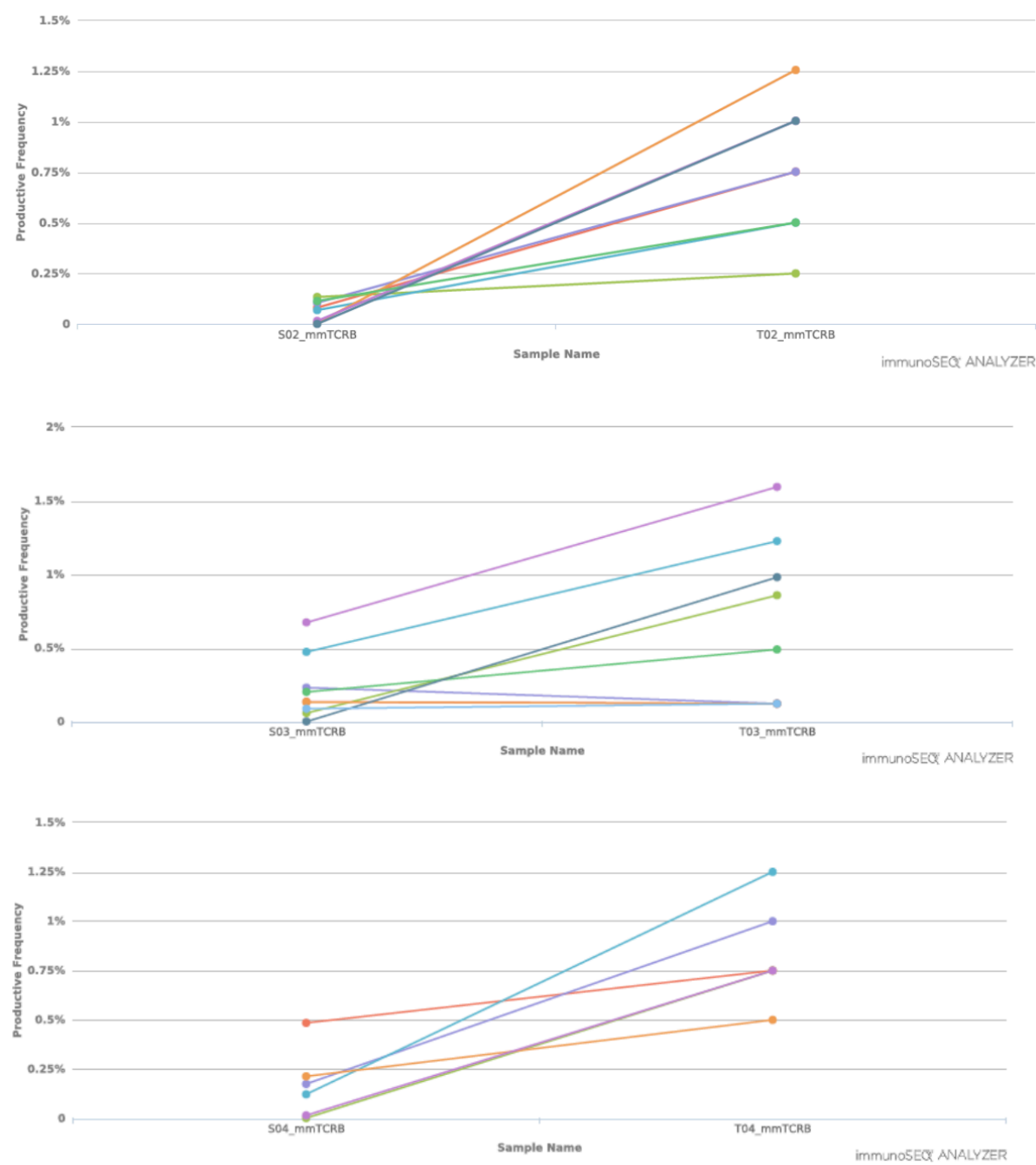


Figura 5.



Pie de figuras

Figura 1. Componente linfocitario en la SP y el bazo de los ratones inmunodeficientes tras la inyección de TILs (número total de células/ml).

Figura 2. Subpoblaciones linfocitarias T por citometría de flujo en la SP y el bazo de los ratones inmunodeficientes tras la inyección de TILs.

Figura 3. Niveles de linfocitos T intratumorales y en SP en los ratones inmunocompetentes.

Figura 4. Distribución de los 10 clones más frecuentes de linfocitos T (en azul) en los tumores y la SP mediante secuenciación del TCR- β . De izquierda a derecha: tumores ratón 02, ratón 03 y ratón 04; SP ratón 02, ratón 03 y ratón 04.

Figura 5. Relación gráfica de las secuencias de TCR compartidas entre la SP y el tumor. De arriba a abajo: ratón 02, ratón 03 y ratón 04.

